

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID-TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels



MEMOIRE DE MAGISTER DE BIOLOGIE

Option : Substances Naturelles, Activité Biologique et Synthèse

Présenté par : **Mme MOSTEFA-KARA Ikrame née BOUBLENZA**

THEME

**Contribution à l'étude de l'analyse de l'huile de
Citrullus colocynthis (Coloquinte)
et de son pouvoir antimicrobien**

Soutenu le : / /

Devant le jury composé de :

Président :

M^r CHABANE SARI D.

Professeur à l'Université de Tlemcen

Examineurs :

M^{me} ATIK BEKKARA F.

Professeur à l'Université de Tlemcen

M^r BENMANSOUR A.

Professeur à l'Université de Tlemcen

M^r ABDELOUAHID D.E.

Professeur à l'Université de Tlemcen

Encadreur :

M^r LAZOUNI H.A.

Maître de Conférences (A) à l'Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2010-2011

À toute ma famille .

Remerciements

Je remercie **Monsieur Lazouni H.A.**, Maître de conférences à l'Université Abou-bakr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils avisés, ses encouragements et son soutien. Je lui exprime, ici, ma profonde gratitude.

Je remercie **Monsieur Chabane Sari D.**, Professeur à l'université Abou-bakr Belkaïd de Tlemcen et Directeur du « *laboratoire de produits naturels* » d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires et d'avoir accepté de présider ce jury. Qu'il trouve ici mon profond respect.

J'adresse toute ma reconnaissance à **Madame Atik Bekkara F.**, Professeur à l'université Abou-bakr Belkaïd de Tlemcen et responsable du magister « Substances naturelles, Activité Biologiques et Synthèse », pour ses discussions, ses conseils et ses encouragements. Je la remercie aussi pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes vifs remerciements vont également à **Monsieur Benmansour A.**, Professeur à l'université Abou-bakr Belkaïd de Tlemcen, pour l'honneur qu'il me fait de participer à ce jury.

J'exprime mes remerciements également à **Monsieur Abdelouahid D.E.**, Professeur à l'université Abou-bakr Belkaïd de Tlemcen pour avoir aimablement accepté de juger ce travail.

Je remercie sincèrement toutes les personnes du laboratoire LAPRONA qui n'ont pas été citées pour la bonne ambiance de travail et l'entraide généralisée au sein de notre laboratoire.

Je remercie aussi les laboratoires : « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique », le laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO), le laboratoire central de microbiologie d'avoir mis à ma disposition le matériel et les produits pour mes recherches et le laboratoire de mycologie de l'université de Béchar pour toute l'aide et les informations qu'il m'a apportées.

Enfin, je remercie sincèrement toutes les personnes qui m'ont aidé et encouragé pour l'aboutissement de ce travail, elles se reconnaîtront.

Résumé

De tout temps, l'homme s'est intéressé aux lipides pour diverses utilisations : agroalimentaire, cosmétologie, médecine,...etc. De nombreuses graines sont sources d'huiles, qui sont de plus en plus étudiées pour leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction de l'huile de graines de *Citrullus colocynthis*, communément appelée Coloquinte.

Dans une première partie de ce mémoire, nous abordons, après extraction, les différentes caractéristiques physico-chimiques de l'huile. Par comparaison avec les paramètres d'autres huiles alimentaires, l'huile de coloquinte semble être une huile qui pourrait être destinée à un usage comestible.

La deuxième partie est consacrée à l'évaluation de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) de l'huile de coloquinte. De ce point de vue, l'huile de coloquinte ne présente pas l'activité attendue.

Table des Matières

Liste des Abréviations	i
Liste des Tableaux	iii
Liste des Figures	iv
Liste des Photos	v
Introduction Générale	1
Chapitre I : Partie Bibliographique	
I- <i>Citrullus colocynthis</i> (la coloquinte)	5
I.1. Présentation de la plante	5
I.2. Classification botanique	6
I.3. Description morphologique	7
I.4. Origine et répartition géographique	8
I.5. Composition chimique de la plante	9
I.5.1 la pulpe	9
I.5.2 les graines	11
I.5.3 les tiges, les feuilles et les fleurs	12
I.5.4 les racines	13
I.6. Propriétés biologiques de la coloquinte	13
I.6.1 Effets thérapeutiques	13
I.6.2 Autres usages	14
I.6.3 Toxicité	14
II- Les huiles végétales	15
II.1. Caractéristiques générales des graines et fruits oléagineux	15

II.2. Extraction de la matière grasse	17
II.2.1 Méthodes gravimétriques	18
II.2.2 Méthodes physiques	19
II.3 Composition et intérêt nutritionnel	20
II.3.1 Rôle des huiles végétales	20
II.3.2 Composition en acides gras	20
II.3.3 Teneurs en d'autres nutriments	23
II.4 détermination des constituants majeurs et mineurs des huiles	25
II.4.1 Détermination des constituants majeurs	25
II.4.2 Détermination des constituants mineurs	32
III- L'huile de coloquinte	37

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I- Extraction de l'huile de coloquinte	40
I.1. Matériel végétal	40
I.2. Extraction de l'huile	40
II- Analyses physico-chimiques de l'huile de coloquinte	41
II.1. Densité	41
II.2. Indice de réfraction	42
II.3. Indice d'acide	43
II.4. Indice de saponification	45
II.5. Indice de peroxyde	46
II.6. Indice d'iode	47
II.7. Mesure de la teneur en insaponifiable	48
III- Evaluation de l'activité anti microbienne de l'huile de coloquinte	50
III.1. Evaluation de l'activité antibactérienne	50

III.1.1 Souches utilisées	50
III.1.2 Isolement et purification	50
III.1.3 Activité antibactérienne	51
III.2. Evaluation de l'activité antifongique	57

Chapitre III : Résultats et Discussions

I- Extraction de l'huile	60
I.1 Mode de séchage des graines	60
I.2 Temps d'extraction	61
I.3 Mode de conservation de l'huile	62
II- Analyse physico-chimique de l'huile de Coloquinte	63
II.1 Densité	63
II.2 Indice de réfraction	64
II.3 Acidité et indice d'acide	65
II.4 Indice de peroxyde	67
II.5 Indice de saponification	68
II.6 Indice d'ester	69
II.7 Indice d'iode	69
II.8 Teneur en insaponifiable	70
II.9 Récapitulatif des résultats	71
III- Analyse microbiologique de l'huile de Coloquinte	73
III.1 Activité antibactérienne de l'huile de coloquinte	73
III.2 Activité antifongique de l'huile de coloquinte	77
Conclusion Générale	79
Références Bibliographiques	82

Annexes

Liste des abréviations

AGMI : Acide Gras Mono-Insaturé

AGPI : Acide Gras Poly-Insaturé

AGS : Acide Gras Saturé

AL : Acide linoléique

ALA : Alpha-Linolénic Acid

ATCC : American Type of Culture Collection

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CL : Chromatographie en phase Liquide

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

DHA : DocosaHexanoïc Acid

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EN : Norme européenne

EPA : EicosaPentanoïc Acid

FFA : Free Fatty Acids

FID : Ionisation De Flamme

FOSFA : Federation of Oils, Seeds and Fats Associations

g : Gramme

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IR : Infrarouge

ISO : International Organization of Standardization

J : Jour

Kcal : Kilocalories

LLL : Trilinoléine

m : Mètre

mg : Milligramme

n : Nombre de doubles liaisons

NC : Nombre de carbone de triglycérides

NEC : Nombre équivalent de carbones

NF: Norme française

nm : Nanomètre

NP : Nombre de Partition

OOO : Trioléine

R : Indice de réfraction

Rdt : Rendement

Rf : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SSS : Tristéarine

T : Température

UFC : Unité Formant la Colonie

UICPA : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

α -TE : Teneur en vitamine E exprimée en α -tocophérol équivalent

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Les différentes dilutions de l'huile de coloquinte avec le DMSO	p56
Tableau n°2 : Les dilutions de l'huile de coloquinte dans le DMSO	p57
Tableau n°3 : Rendement en huile des graines séchées à l'air et à l'étuve	p60
Tableau n°4 : Rendement en huile selon le temps d'extraction	p61
Tableau n°5 : Densités de quelques huiles végétales	p63
Tableau n°6 : Indices de réfraction de quelques huiles	p65
Tableau n°7 : Taux d'acidité oléique dans différentes huiles végétales	p66
Tableau n°8 : Indices d'acide de quelques huiles végétales	p67
Tableau n°9 : Indices de saponification de différentes huiles végétales	p68
Tableau n°10 : Valeurs des indices d'iode de différentes huiles végétales	p70
Tableau n°11 : Teneur des huiles végétales en insaponifiable	p71
Tableau n°12 : Récapitulatif des résultats d'analyses physico-chimiques de l'huile	p72
Tableau n°13 : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions des différentes huiles	p74
Tableau n°14 : Présentation des résultats de l'activité antifongique de l'huile	p77

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie de la plante	p7
Figure 2 : Structure de la cucurbitacine E	p9
Figure 3 : Structure de l'acide caféique	p10
Figure 4 : Structure de l'acide chlorogénique	p10
Figure 5 : Structure de l'acide linoléique	p11
Figure 6 : Structure de la quercétine et du kaempférol	p12
Figure 7 : Composition de la graine de tournesol	p16
Figure 8 : Composition de la graine de soja	p16
Figure 9 : Structure de l'acide α -linoléique	p21
Figure 10 : Classement des principales huiles végétales par catégorie d'acides gras	p22
Figure 11 : Structure des triglycérides	p25
Figure 12 : Triglycérides de beurre de cacao par CPG	p26
Figure 13 : Triglycérides d'huile d'olive par HPLC	p27
Figure 14 : Les trois étapes nécessaires au dosage des acides gras	p29
Figure 15 : Fractionnement des composés insaponifiables par CCM	p33
Figure 16 : Stérols d'huile de tournesol par CPG	p34
Figure 17 : Tocophérols par HPLC	p35
Figure 18 : Extracteur Soxhlet	p40
Figure 19 : Ensemencement par écouvillonnage	p53
Figure 20 : Diffusion en gélose par la méthode des disques	p54
Figure 21 : Test de synergie d'activité antibactérienne des deux huiles	p55

Liste des photos

- Photo 1** : Fruits de coloquinte **p5**
- Photo 2** : Graines de coloquinte **p8**
- Photo 3** : Zones d'inhibitions de l'huile de nigelle de la souche *bacillus cereus* **p74**
- Photo 4** : Zones d'inhibitions de l'huile de nigelle de la souche *Staphylococcus aureus* **p74**
- Photo 5** : Test de synergie entre l'huile de coloquinte et l'huile de nigelle **p75**
- Photo 6** : Ensemencement par spot **p76**
- Photo 7** : Effet de l'huile de coloquinte sur *Cladosporium herbarum* **p78**

Introduction Générale

Face à la maladie et à la recherche incessante de l'homme qui, observant la nature et les effets de ses propres expériences, a depuis longtemps découvert que le monde végétal est porteur d'une multitude de solutions aux problèmes de santé qui affligent les humains **(Sirois, 2008)**.

La quête des remèdes au sein du règne végétal date de plusieurs millénaires. Grâce à la transmission orale des savoirs, l'écriture a grandement contribué au transfert entre des générations des connaissances empiriques sur les plantes médicinales.

Dans bien des poèmes, les plantes sont évoquées lors de comparaisons ou de métaphores assez conventionnelles comme Antara Ibn Shadad Al-Absi (525-615) a vanté sa vengeance contre ses ennemies amère comme *la coloquinte* **(Dero, 1998)**.

Depuis le 19^e siècle, les scientifiques s'appliquent à isoler des molécules responsables de l'activité thérapeutique des plantes. En 1999, neuf des vingt médicaments les plus vendus provenaient d'extraction végétale.

A ce jour, moins de 15% des 250 000 espèces connues du règne végétal auraient fait l'objet d'analyse visant à y déterminer la présence de molécules bioactives **(Balandrin et al., 1993)**.

Et parmi ces molécules bioactives se trouvent *les corps gras* qui ont fait l'objet de beaucoup de recherches explorant ce monde sans frontières.

Les corps gras occupent une place importante dans le monde ; les trois quarts de la production sont destinés à l'alimentation, le reste se partage entre les applications industrielles, pharmaceutiques et cosmétiques.

Dans l'alimentation, certaines huiles végétales apportent à l'organisme des vitamines liposolubles et des acides gras essentiels. Contrairement aux corps gras d'origine animale,

elles contiennent une teneur élevée en acides gras insaturés ce qui limite avantageusement le cholestérol sanguin.

Les oléagineux industriels sont particulièrement importants sur le plan économique en raison de leur caractère irremplaçable.

Par ailleurs, le mot « gras » a suscité des réactions d'horreur chez des générations de professionnels de la santé et de la nutrition ; pourrait-on pour cela se passer d'eux et les éliminer de notre régime alimentaire ??

« Loin de les fuir, apprenons à les apprivoiser » (Lecerf, 2010)

Chaque corps gras a son empreinte spécifique, sa signature en acides gras qu'il soit d'origine animale ou végétale. Ils ne représentent pas uniquement une réserve de calories mais aussi une source d'acides gras, dont les fonctions biologiques et les effets spécifiques sont multiples.

En plus des acides gras, les vertus des huiles résident notamment dans leur insaponifiable, c'est à dire dans leur partie non lipidique qui contient de nombreuses molécules tels que les polyphénols en tout genre, les terpènes, les stérols, les caroténoïdes, les tocophérols,... etc. Toutes ces molécules confèrent à chaque huile des propriétés particulières comme par exemple l'utilisation à visée cardio-vasculaire, antiproliférative (anti cancer) ou bien encore antidiabétique. Les propriétés thérapeutiques ne sont pas propres seulement à l'huile d'olive, mais aussi à l'huile d'argan qui pourrait lui ravir la vedette, ou encore de l'huile de nigelle, de pépin de courge, d'argousier...

Deux thèmes sont abordés dans ce mémoire et lui donnent sa substance :

-Une étude physico-chimique qui permettra de caractériser l'huile de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) et de lui trouver des applications dans le domaine agro-alimentaire, pharmaceutique, cosmétique ou industriel.

-Une étude microbiologique pour évaluer les propriétés antimicrobiennes de cette huile.

Chapitre I

Partie Bibliographique

I. *Citrullus colocynthis* (la coloquinte)

I.1. Présentation de la plante

La coloquinte est une plante herbacée, vivace de la famille des cucurbitacées. Sa tige est munie de vrilles et son fruit est une grosse baie sphérique de couleur ocre à maturité, de la dimension d'une grosse orange, lisse à sarcocarpe spongieux. Ses feuilles sont multilobées et velues et ses fleurs sont jaunes. Le fruit est d'un goût très amer (**Baba Aissa, 2000**).



Photo 1 : Fruits de coloquinte

Les Anglais donnent le nom de «bitter apple » à la coloquinte pour l'amertume de ses fruits, les Espagnols « Coloquintida » et les Algériens lui attribuent plusieurs noms vernaculaires comme *hidedj* حدىج, *handhal* حنظل , *tifersit* ou *taferzizt* تيفرسيت , *tabarka* طبركة, *says* صيص , *âlqam* علقم , *mararet essahra* ممرارة الصحراء...

Malgré l'amertume de cette plante, les fruits sont mangés par les animaux de pâturage comme les gazelles, les ânes et les autruches ; les graines sont stockées par les rongeurs pour leur richesse nutritive. Les caprins et le gibier se nourrissent quant à eux de tiges et de feuilles de coloquinte.

Les bédouins consomment les graines après les avoir trempées dans l'eau, ce qui leur donne un apport en lipides et en protéines, et sont ainsi capables de survivre dans des conditions extrêmes (**Duke, 2008**).

I.2. Classification botanique

Citrullus colocynthis appartient à la famille des cucurbitacées qui comprend à peu près 100 genres et 750 espèces. Cette famille est connue pour sa grande diversité génétique et sa grande adaptation aux régions tropicales, subtropicales et les déserts arides (**Giwa et al., 2010**).

En région tempérée, cette famille est connue particulièrement par ses fruits comestibles : les courges (*Cucurbita*), les melons (*Cucumis melo*), les concombres (*Cucumis sativus*), les pastèques (*Citrullus lanatus*)...

La coloquinte constitue la transition entre les espèces alimentaires et les espèces toxiques comme la byrone (*Byronia*) ou le concombre d'âne (*Ecballium*) puisqu'une consommation excessive de ces fruits peut entraîner la mort (**Armougom, 1998**).

La botanique à laquelle incombe la classification des espèces végétales, différencie la famille des cucurbitacées de la façon suivante:

EMBRANCHEMENT : *Ptéridophytes*

SOUS-EMBRANCHEMENT : *Angiospermes*

CLASSE : *Dicotylédones*

SERIE : *Gamopétales tétra cycliques inférovariées à étamines libres*

ORDRE : *Curcubitales*

FAMILLE : *Cucurbitaceae*

GENRE : *Citrullus*

Nom binomial: ***Citrullus colocynthis*** (L.) Shrad. 1838

On peut trouver la coloquinte sous d'autres noms tels que: *Cucumis colocynthis* Linné, (1753); *Colocynthis vulgaris* Schrader, (1833); *Cucumis pseudocolocynthis* Wender (1834) et *Colocynthis officinalis*, Schrader (1838) (**Fursa et al., 1982; Esquinas-Alcazar and Gulick, 1983; Burkill, 1985; Hanelt, 2001**).

I.3. Description morphologique

Citrullus colocynthis est une plante monoïque (fleurs mâles et fleurs femelles séparées). La pollinisation se fait naturellement par des insectes (**Munger et al., 1991**).

C'est une plante bisannuelle, à tiges rampantes munies de feuilles palmatilobées à 3-5 segments, crénelées ; fleurs jaunes pâles ou verdâtres, solitaires à pédoncules courts, axillaires ; corolles à 5 pétales ovales, à marge sinueuse ; 5 étamines à anthères épaisses se touchant entre elles (**Baba Aissa, 2000**).

Les tiges, assez grêles et souvent cannelées, peuvent dépasser 10 mètres. Au niveau de chaque nœud se différencie un complexe axillaire se composant d'une ou de plusieurs feuilles, d'une ou de plusieurs inflorescences, d'une ramification ou d'une vrille. Les vrilles, simples ou ramifiées, permettent aux tiges de s'accrocher à un support (**Armougom, 1998**).

La plante peut produire 15 à 30 fruits de 7 à 10 cm de diamètre en moyenne (**Feinbrun-Dothan., 1978 ; Zohara et al.,1999**).

Les fruits sont des baies appelées aussi pépons ou péponides, globuleux de 8 à 12 cm, à épicarpe coriace, de couleur verte tachetée ou marbrée qui devient jaune à maturité et à pulpe blanchâtre à saveur très amère contenant de très nombreuses graines.

Les grosses baies peuvent contenir jusqu'à 500 graines par unité (**Casimir, 1992**).

La section transversale du fruit montre à



Figure 1 : Morphologie de la plante

l'intérieur une fente étoilée à 3 branches rayonnantes, chaque secteur comprend les placentas volumineux portant de très nombreuses graines ovoïdes et jaunâtres (**Armougom, 1998**).

Les graines sont petites (à peu près 6 mm de long), lisses et brunes à maturité (**Jayaraman et al., 2009**).



Photo 2 : Graines de coloquinte

Les proportions de la pulpe, graines et écorce sont 15 :62 :23 respectivement dans 100g de fruit sec (**Panda, 2000**).

I.4. Origine et répartition géographique

La coloquinte était aussi bien connue chez les civilisations Grecques et Romaines que chez les Arabes (le *Handhal* est mentionné par Ibn El-Baytar dans ses prescriptions). Elle est aussi mentionnée dans un herbier Anglais du 11^{ème} siècle (**Trease, 1976 ;Memon et al.,2003**).

Originnaire de l'Asie tropicale et d'Afrique, la coloquinte pousse spontanément dans le bassin méditerranéen et la zone pré désertique d'Afrique et d'Asie (Inde et Ceylan). Elle est cultivée essentiellement aux îles grecques, en Syrie, en Egypte pour ses fruits. Récoltés à l'automne lorsqu'ils commencent à jaunir, ces derniers sont pelés au couteau et séchés au soleil ou à l'air chaud (**Takagi et al., 1981 ; Armougom, 1998**).

I.5. Composition chimique de la plante

I.5.1 La pulpe

Les cucurbitacées sont reconnues comme source de carbohydrates et de métabolites secondaires : les cucurbitacines.

Les cucurbitacines appartiennent aux groupes des triterpènes tétracycliques, ce sont des molécules en C30 ou C32 possédant 7 à 9 atomes d'oxygène et plusieurs groupes méthyle ou acétyle. Elles peuvent être libres ou associées à un sucre. Ce sucre peut être attaché directement au noyau stéroïdien ou/et à la chaîne aliphatique (**Harborne et al., 1993**).

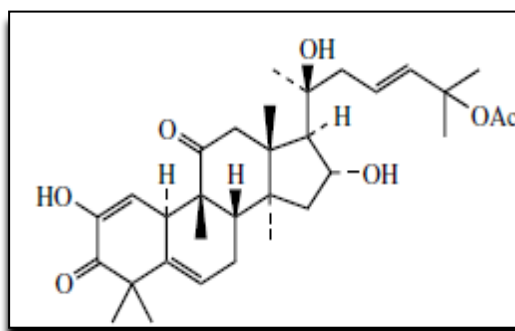


Figure 2 : Structure de la cucurbitacine E

La présence des cucurbitacines responsables de l'amertume peut engendrer des propriétés purgatives de cucurbitacées (racine de byrone, fruit de coloquinte, suc d'élatrium) (**Takagi et al., 1981**).

La présence de cucurbitacines est liée à des facteurs génétiques, au stade de développement de la plante ainsi qu'à des facteurs environnementaux puisqu'ils représentent un moyen de défense de la plante. Ces composés apparaissent sous forme libre ou liés à un sucre. Ce sucre peut être attaché directement au noyau stéroïdien et/ou à la chaîne latérale aliphatique (**Blaise, 1997**). Ce sont des substances particulièrement toxiques (DL_{50} voisine de 1mg/kg chez la souris en I.P.) amères, cytotoxiques, elles confèrent aux drogues qui en renferment des propriétés purgatives drastiques comme les graines de coloquinte (**Bruneton, 1993**).

De nombreux travaux sur l'extraction de ces principes actifs ont été menés avec succès. C'est ainsi qu'une quinzaine de cucurbitacines ont été isolées à partir des cucurbitacées et désignées par les lettres de l'alphabet : cucurbitacines A, B, C, D, E...**(Armougom, 1998)**.

Parmi les cucurbitacines qui ont été identifiés à partir de l'extrait méthanolique de la plante de *Citrullus colocynthis* sont E, I, J, K et L **(Bauer et al., 1983 ; Seger et al.,2005 ; Sturm et al., 2009)**.

Plusieurs de ces composés (cucurbitacines glucosides) ont diminué la croissance des cellules cancéreuses (cancer du sein) en provoquant des changements de la morphologie globale des cellules en diminuant l'organisation des filaments d'actine du cytosquelette **(Tannin-spitz et al., 2007)**.

Par ailleurs, une revue de la littérature scientifique portant sur la grande famille des cucurbitacines souligne que ces molécules pourraient aussi protéger les cellules du foie contre certains composés toxiques, et aurait également des effets anti-inflammatoires. Puisque ces études sont essentiellement in vitro, ces résultats ne peuvent pas pour l'instant être appliqués à l'humain, et des chercheurs soulignent qu'il est impératif de mieux étudier ces composés afin de vérifier si certains d'entre eux ont des effets indésirables **(Jayaprakasam, 2003 ; Chen, 2005 ; Vanier, 2006)**.

D'autres métabolites secondaires tels que l'acide caféique, l'acide chlorogénique, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les terpènes existent aussi dans le fruit **(Galal, 1997 ; Gulcan, 2006 ; Tehila, 2007 ; Jayaraman et al., 2009)**.

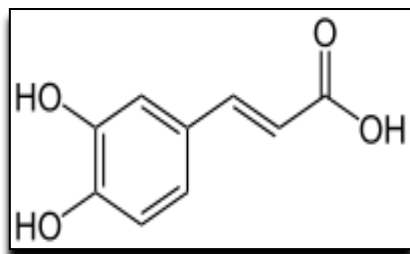


Figure 3 : Structure de l'acide caféique

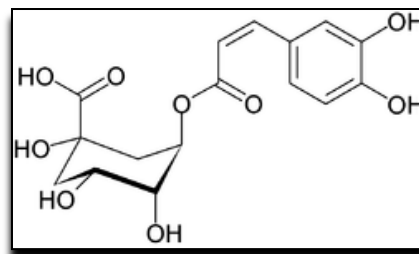


Figure 4 : Structure de l'acide chlorogénique

I.5.2 les graines

Les graines de *Citrullus colocynthis* représentent une bonne source de protéines et de lipides, elles font l'objet de beaucoup de recherches.

➤ **Les protéines** : la fraction protéique représente 8,25% en poids des graines ; elle est riche en lysine, leucine et les acides aminés soufrés telle la méthionine (**Shaheen et al., 2003**).

Au cours de la germination des graines, les globulines sont utilisées avant les albumines; leur destruction permet l'élaboration des protéines à la jeune plante (**Jacks et al., 1979 ; Courtois et al., 1981**).

Notons qu'un acide aminé non protéique présentant une activité anti-helminthique a été identifié dans les graines de cucurbitacées ; il s'agit de la 3-amino-3-carboxypyrolidine ou cucurbitine (**Gurudeeban et al., 2010**).

Les protéines des cucurbitacées intéressent également l'industrie. Ainsi en Roumanie, elles sont utilisées pour la fabrication de colle à papier ou à bois.

➤ **Les glucides** : l'acide phytique ou ester hexaphosphorique de l'inositol identifié dans les graines représente une source importante de phosphate. En outre, les graines contiennent 70 à 80 % de phytine (sels métalliques d'acide phytique). Des triterpènes tétracycliques ou sous forme de glucosides appelés cucurbitacines sont présents. En revanche, l'amidon est apparemment absent (**Courtois et al., 1981**).

➤ **Les lipides** :

Les graines de coloquinte sont riches en acides gras tels l'acide myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linoléinique (**Khatri et al., 1993**).

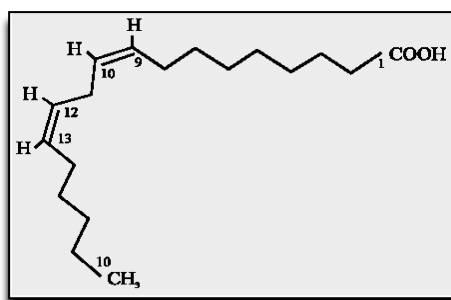


Figure 5 : Structure de l'acide linoléique

Akhtar et *al.* (1999) rapportent que durant la germination des graines de coloquinte à l'obscurité à 30°C, la quantité relative de triacyl glycérols diminue, et le taux d'acides gras libres augmente de manière significative. Cependant, il a été mentionné que le taux d'acides gras saturés augmente par rapport aux acides gras insaturés (qui baisse graduellement pendant la germination).

La composition qualitative et quantitative des acides gras des huiles comestibles sont similaires à celle des huiles commercialisées (huile de soja, tournesol...). Leur richesse en acides gras insaturés ainsi que leur forte teneur en acide linoléique confèrent à ces huiles de bonnes propriétés diététiques (**Grompone, 1988 ; Karlesking, 1992**).

I.5.3 Les tiges, les feuilles et les fleurs

Les feuilles et les fleurs de la coloquinte renferment de la quercétine et du kaempférol (**Khare, 2007 ; Meena et al., 2008**). Ce sont deux flavonols pourvus d'un excellent pouvoir antioxydant.

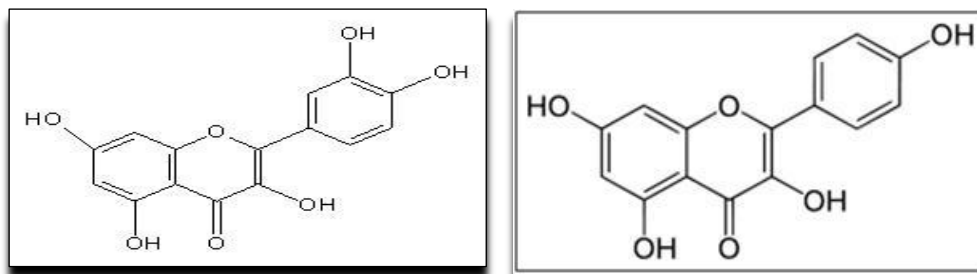


Figure 6 : Structures de la quercétine et du kaempférol

L'activité anti-oxydante au niveau des feuilles et des tiges de *Citrullus colocynthis* a révélé la présence des enzymes anti-oxydantes telles la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), la glutathione reductase et la glutathione-S-transférase ; et d'autres molécules non-enzymatiques anti-oxydantes comme l'acide ascorbique, α -tocophérols, les caroténoïdes et les flavonoïdes comme cités ci-dessus. Ceci a permis de conclure que *Citrullus colocynthis* pourrait être une bonne source d'anti-oxydants. Par ailleurs, l'extrait (éther de pétrole) de feuilles a un effet anesthésiant local testé sur des grenouilles et un effet larvicide sur quelques espèces de moustiques (**Abdul Rahman et al., 2008 ; Ramanathan et al., 2011**).

I.5.4 les racines

C'est la partie de la plante où il y a eu le moins de recherches ; peu d'informations ont été élucidées sur les molécules présentes à ce niveau ; Khare (2007) a parlé de la présence de composés aliphatiques.

D'autres composés existent au niveau des racines comme l'hentriacontane (alcane longue chaîne hydrocarbonnée) et saponines (**Memon et al., 2003**).

I.6. Les propriétés biologiques de la coloquinte

1.6.1 Effets thérapeutiques

La pulpe mûre et séchée a un effet purgatif énergétique, antinéoplasique, antihypertension, anti goutte, anti-arthrite et peut être un remède pour la congestion cérébrale, le rhumatisme et la sciatique (**Armougom, 1998**). Elle peut être aussi utilisée pour traiter les hémorroïdes et les varices (**Khare, 2007**).

A forte dose, elle est émétique et irrite les muqueuses gastro-intestinales et, à petites doses un bon expectorant.

En pharmacie moderne, l'extrait sec de la coloquinte entre dans la formulation des comprimés traitant les affections hépatiques, les fièvres, les parasites intestinaux, la constipation et la congestion cérébrale (**Anonymous, 1970 ; Memon et al., 2003**).

La pâte des racines s'applique aux différentes inflammations et tuméfactions. Dans le traitement de rhumatisme, 180g de mixture de racines et de poivre long à quantité égale sont pris tous les jours par le malade. Pour les inflammations intestinales et tumeurs, la poudre de racines mixée avec l'huile de ricin est administrée au malade, et la poudre seule peut être utilisée comme insecticide (**Dastur, 1962 ; Panda, 2000**).

Le cataplasme des feuilles est utilisé dans les migraines et les névralgies (**Kirtikar et al., 1957 ; Akhar, 1994 ; Khare, 2007**).

En Algérie, le traitement par le fruit du *Citrullus coloyntis* diffère d'une région à une autre sauf pour le traitement du diabète, où c'est toujours un traitement externe pour les trois régions :

- ❖ Dans la région d'El Goléa, en plus du traitement du diabète, il est utilisé pour les dermatoses, odontalgies, infections génitales et algies rhumatoïdes.
- ❖ Dans la région de Béni Abbès, on s'en sert surtout pour les infections génitales et les algies rhumatoïdes.
- ❖ Dans la région de Ouargla, on traite des plaies, des dermatoses et des piqûres de scorpions (**Maiza et al, 1993**).

1.6.2 Autres usages

Les graines de la coloquinte sont comestibles. Dans les pays d'Afrique de l'Est, ces graines sont consommées, torrifiées (snacks), frites ou aussi sous forme de « cake » à partir de la farine des graines (**Odunfa, 1981 ; Ikereogu 1984 ; Okigbo, 1984**).

Au Nigeria, la graine est un bon épaississant pour la soupe « egusi » ou aussi après fermentation pour la préparation de « ogiri » qui est un agent aromatisant utilisé comme condiment (**Memon et al., 2003**).

1.6.3 Toxicité

Bien que trop amère pour être consommée par erreur, la coloquinte est tout de même responsable d'accidents plus ou moins sévères résultant particulièrement de problèmes de doses. Les symptômes de surdosage, selon le mode d'administration, peuvent être de différentes natures: violentes coliques, vives douleurs épigastriques et rénales, ténesmes, nausées, vomissements, délire, rétention d'urine, crampes, hoquet, avortement. (**Merad, 1973**). La poudre de pulpe est toxique à 0,6-1g/Kg ; les recherches ont montré que le fruit a une activité cancérogène (**Khare, 2007**).

II. Les huiles végétales

Les huiles et les graisses jouent un rôle majeur dans notre alimentation ; nous les consommons directement sous forme d'huile raffinée ou vierge, ou bien indirectement à partir de nombreux produits de l'agro-alimentaire. Le consommateur que nous sommes se montre de plus en plus exigeant en termes de qualité : la sécurité alimentaire et les aspects nutritionnels sont au centre de préoccupations sociétales actuelles.

En parallèle, l'utilisation des huiles végétales se développe dans le secteur non alimentaire ; cela résulte de leurs caractéristiques, de leur origine renouvelable et de leur caractère biodégradable. La formule maintenant usitée « de l'or noir à l'or vert » illustre ce nouvel engouement pour une chimie basée sur les agroressources de notre planète. Le développement des biocarburants (esters d'huiles végétales) en est un exemple.

- Pour toutes ces applications des domaines alimentaire et non alimentaire, la maîtrise de procédés éprouvés et efficaces est nécessaire.
- De la graine à l'huile raffinée et transformée, les technologies d'obtention et de transformation des huiles se doivent de garantir parfaitement la qualité du produit et de fournir en final un produit répondant à des spécifications très complètes ; ces technologies ont su évoluer pour répondre à cette problématique et intégrer les contraintes actuelles de l'industrie de rentabilité et de respect de l'environnement (Pagès, 2008).

II.1. Caractéristiques générales des graines et fruits oléagineux

Les graines et fruits oléagineux contiennent des lipides de réserve pour la germination (dans la graine ou dans le noyau du fruit) ou bien constitutifs de la chair du fruit. Ces lipides, constitués essentiellement par des triesters d'acides gras et de glycérol ou triglycérides sont susceptibles de se dégrader suivant deux phénomènes distincts qui sont l'hydrolyse et l'oxydation.

Dans les graines oléagineuses par rapport aux fruits oléagineux, l'huile est mieux protégée. Elle est stockée à l'intérieur des cellules aux parois rigides et elle est en outre entourée d'une coque et son humidité est beaucoup plus faible (de l'ordre de 10 %). Moyennant certaines précautions, le stockage de longue durée est possible. (Pagès , 2008).

Composition de quelques graines oléagineuses :

Les graines oléagineuses se composent essentiellement d'une enveloppe ou tégument (coque) riche en cellulose et d'un embryon encore appelé amande riche en huile. Les compositions des graines oléagineuses à savoir colza, tournesol et soja sont reportées dans les figures 7 et 8.

Il est à signaler que les teneurs ou les compositions indiquées sont massiques.

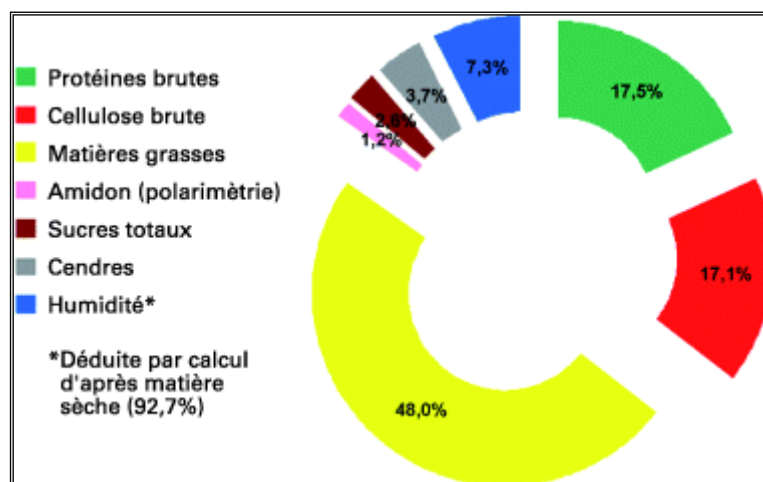


Figure 7 : Composition de la graine de tournesol

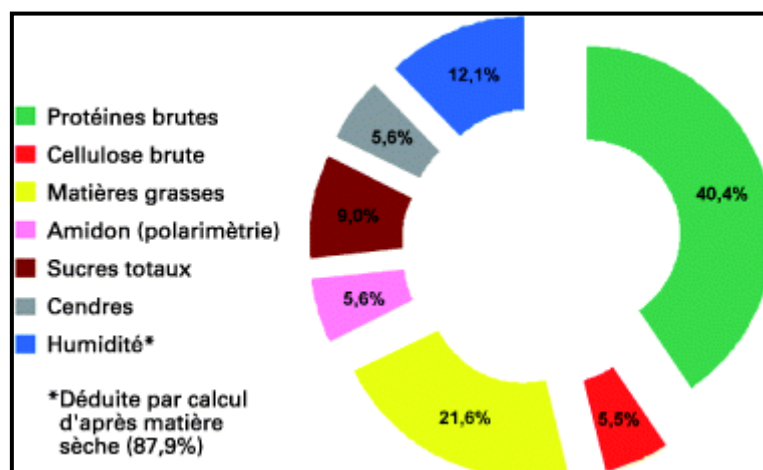


Figure 8 : Composition de la graine de soja

Les graines dont la teneur en matière grasse est supérieure à 35 % sont dites riches en huile (colza, tournesol, arachide). Leur trituration industrielle met en œuvre des opérations de prépression et d'extraction au solvant ; les graines dont la teneur en huile est inférieure à 35 % dites pauvres en huile sont directement triturées par extraction sans prépression préliminaire.

L'olive est un fruit contenant peu d'huile (20 % environ), beaucoup d'eau chargée de substances glucidiques (70 %) et un noyau. Les olives cueillies à maturité doivent être traitées rapidement pour garantir l'obtention d'une huile de bonne qualité, compte tenu que cette dernière est vendue le plus souvent sous l'appellation vierge et donc non raffinée et qu'elle doit présenter des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques conformes **(Pagès, 2008)**.

II.2 Extraction de la matière grasse

L'extraction des corps gras a le plus souvent un double objectif :

- le dosage de la matière grasse ;
- l'analyse de la matière grasse extraite.

Elle doit donc être totale et ne pas modifier la nature de la matière grasse.

Il existe de nombreuses méthodes de dosage de la matière grasse:

1. Méthodes gravimétriques :

- Extraction par un solvant sans traitement préalable.
- Extraction par un solvant après traitement chimique préalable (acide ou alcalin).

2. Dosage direct par spectrométrie

- RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)
- IR (Infrarouge).

II.2.1 Méthodes gravimétriques

a) Extraction de l'huile par un solvant sans traitement préalable

Quelquefois, il est nécessaire d'éliminer dans un premier temps la phase aqueuse, soit par dessiccation à l'étuve, soit par séchage sur sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4 .

La fraction des lipides peu liée à la matière à analyser appelée « les lipides libres » ou « matières grasses libres » s'extrait à la température du laboratoire à l'aide des solvants **(Adrian et al., 1998)**.

Les solvants les plus souvent utilisés sont l'oxyde diéthylique, l'hexane, les mélanges chloroforme-méthanol (2-1 v/v) (réactif de Folch), chloroforme-isopropanol (3-2 v/v), dichlorométhane-méthanol (2-1 v/v). Il est important de préciser la méthode utilisée car les différents solvants n'ont pas le même pouvoir extracteur (en particulier envers les phospholipides). Dans le cas de l'analyse quantitative, l'extrait est ensuite purifié sur une colonne constituée d'un mélange sulfate de sodium anhydre **(Ollé, 2002)**.

Quel que soit le protocole retenu, il est indispensable de préciser les conditions opératoires (nature du solvant, température d'extraction, etc) pour pouvoir interpréter les résultats **(Lecoq, 1965)**.

b) Extraction après traitement chimique

Le traitement chimique est le plus souvent une hydrolyse destinée à détruire les lipoprotéines, modifier les structures des peptides et glucides pour extraire les lipides totaux (lipides libres+ lipides liés). Ce sont les méthodes de Folch et al. (1957) et de Bligh et Dyer (1959) qui sont les plus utilisées. Un solvant ternaire chloroforme/méthanol/eau est mélangé à l'échantillon pour déplacer les lipides et les dissoudre dans la phase chloroformique tandis que la phase supérieure constituée d'un mélange de méthanol aqueux contient les substances non lipidiques **(Adrian et al., 1998)**.

Dans tous les cas, les méthodes avec traitement chimique ne permettent pas une étude correcte de la composition et de la qualité de la matière grasse obtenue.

II.2.2 Méthodes physiques

a) Résonance magnétique nucléaire RMN basse résolution

C'est une méthode basée sur la mesure par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire à basse résolution et à onde pulsée de la teneur en composés liquides contenant de l'hydrogène. Elle est rapide et non destructrice et a été utilisée avec succès pour déterminer la teneur en huile des graines oléagineuses. La RMN nécessite de connaître la nature de la matière grasse car l'appareil doit être étalonné avec un corps gras identique à celui que l'on veut doser ; la teneur est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage

Elle ne peut s'appliquer à des composés contenant des corps gras inconnus présents dans les graines oléagineuses, préalablement séchées à $(103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ (Bauman et al., 1963 ; Adrian et al., 1998 ; Ollé, 2002).

b) Infrarouge

Cette méthode est basée sur le principe que les différents constituants des graines présentent des spectres d'absorption caractéristiques dans l'infrarouge, mais se chevauchant. Les auteurs ont démontré que, si l'on réalise les mesures à six longueurs d'onde différentes par un système à trois équations, il est possible de déterminer à la fois l'humidité, les protéines et les matières grasses. Comme pour la RMN, il est nécessaire d'étalonner l'appareil afin de déterminer les constantes spécifiques de chaque constituant pour chaque type de produit à analyser (Ollé, 2002).

II.3 Composition et intérêt nutritionnel

II.3.1 Rôle des huiles végétales

Les huiles végétales remplissent quatre rôles principaux :

- nutritionnel : apport d'énergie et de nutriments (acides gras, vitamines liposolubles, constituants mineurs d'intérêt tels que les phytostérols ou les composés phénoliques pour l'huile d'olive) ;
- organoleptique (flaveur et support d'arômes) ;
- rhéologique (texture) ;
- technologique (fluide de transfert de chaleur, par exemple dans les utilisations en friture).

Elles sont principalement composées de triglycérides (90 à 99 %) eux-mêmes essentiellement constitués d'acides gras (90 à 95 %) et de glycérol (3 à 5 %) et, de constituants mineurs naturels (1 à 5 %) regroupant des composés de structure variée tels que les stérols, tocophérols, caroténoïdes (0,1 à 0,2 %). (Pagès, 2008).

II.3.2 Composition en acides gras

Constituants majoritaires, les acides gras sont classés en trois groupes :

- Les acides gras saturés (**AGS**), chaînes hydrocarbonées sans insaturation (double liaison), avec principalement des longueurs de chaîne comprises entre 16 (acide palmitique) et 18 atomes de carbone (acide stéarique).
- Les acides gras monoinsaturés (**AGMI**) à chaînes hydrocarbonées comportant une double liaison et dont le principal représentant est l'acide oléique (C18:1, n-9 ou ω 9) ;
- Les acides gras polyinsaturés (**AGPI**) à chaînes hydrocarbonées comportant plusieurs doubles liaisons, dont on connaît les deux principaux qui sont les acides linoléique (C18:2 n-6 ou ω 6) et α -linoléique (C18:3 n-3 ou ω 3), acides gras essentiels et indispensables.

Les $\omega 3$ jouent un rôle central au niveau des membranes cellulaires et interviennent dans de nombreux processus biochimiques de l'organisme comme la régulation de la tension artérielle, l'élasticité des vaisseaux, les réactions immunitaires et anti-inflammatoires, l'agrégation des plaquettes sanguines...

Dans cette famille, seul l'acide alpha-linolénique (ALA) est dit « essentiel ». En effet, les autres acides gras $\omega 3$ peuvent être fabriqués par l'organisme à partir de l'alanine. C'est notamment le cas de l'acide eicosapentanoïque (EPA) et de l'acide docosahexanoïque (DHA).

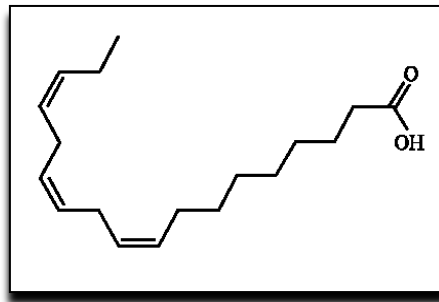


Figure 9 : Structure de l'acide α -linoléique (C18 :3 $\omega 3$)

Les sources d' $\omega 3$ se trouvent dans les aliments suivants :

- d'origine végétale : huile de lin, huile et noix de Grenoble, graine et huile de chanvre, soja et huile de soja, huile de colza, huile de germe de blé...
- d'origine animale : poissons et huiles de poissons gras comme le thon, la sardine, le saumon, le flétan, le maquereau, le hareng, la graisse animale et le beurre.

Les $\omega 6$ jouent un rôle primordial dans le maintien du bon fonctionnement du système nerveux, de l'équilibre cardiovasculaire, de l'immunité, de la guérison des blessures et des réactions allergiques et inflammatoires.

Dans cette famille, seul l'acide linoléique (**AL**) est dit « essentiel ». En effet les autres acides gras $\omega 6$ peuvent être fabriqués par l'organisme à partir de l'alanine.

Contrairement aux $\omega 3$, les $\omega 6$ sont abondamment présents dans l'alimentation moderne :

- d'origine végétale : huile de pépins de raisin, de tournesol, de noix, de maïs, de bourrache, d'onagre, de carthame, de germe de blé, de soja, de sésame, de colza, d'arachide, de noisettes, d'olive...

- d'origine animale : œufs entiers, beurre, huile de foie de morue et graisse d'animaux (Eude, 2005).

Les huiles végétales peuvent ainsi être regroupées en fonction de la nature de leurs acides gras majoritaires (ou spécifiques) : huiles oléiques, linoléiques ou α -linoléiques.

La figure 10 présente les principales huiles végétales selon cette classification :

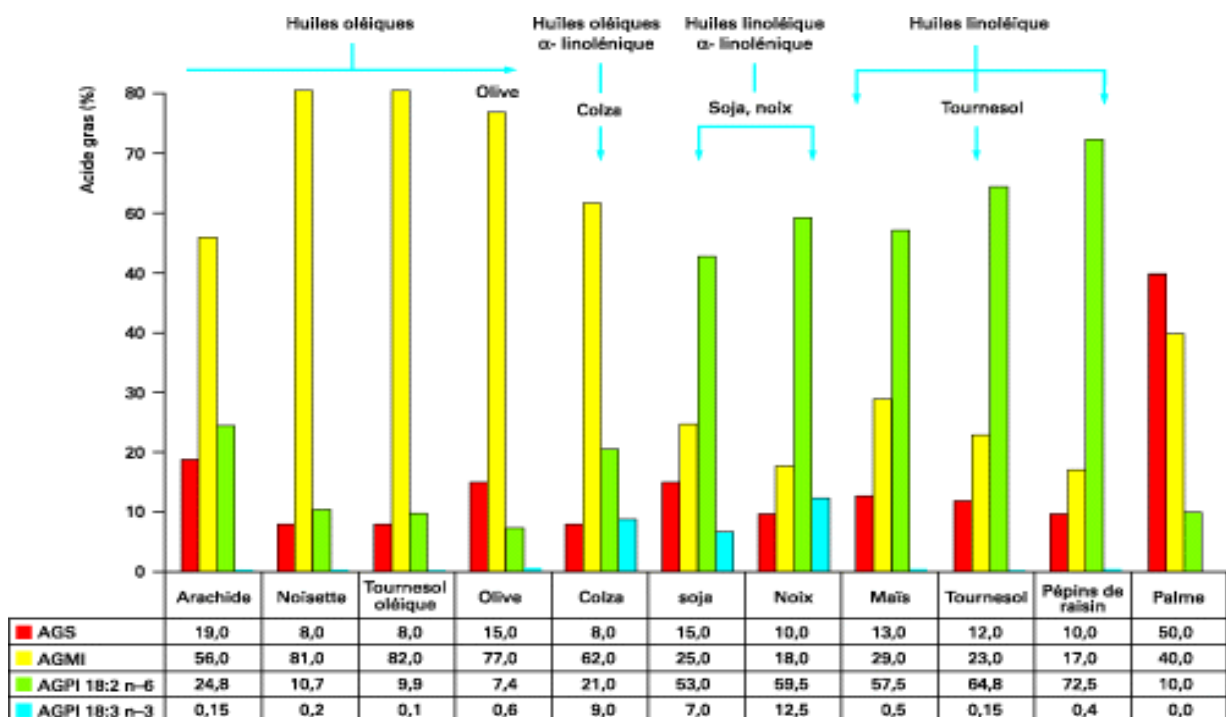


Figure 10 Classement des principales huiles végétales par catégorie d'acides gras (saturés, monoinsaturés et polyinsaturés)

- **les huiles oléiques (AGMI)** : olive, colza, tournesol oléique... avec des pourcentages relatifs en acide oléique compris entre 55 et 85 % ;
- **les huiles linoléiques (AGPI, C18 :2 ω 6)** telles que le tournesol; la noix, le soja, les pépins de raisin...les huiles de ce groupe ont des pourcentages relatifs en acide linoléique compris entre 55 et 75 % ;

- **les huiles α -linoléniques (AGPI, C18 :3 ω 3)** telles que le colza, la noix et le soja. Ces huiles ont des pourcentages relatifs en acide α -linoléniques compris entre 7 et 13 % environ.

L'acide α -linoléniques n'est pas le composant majoritaire mais l'acide gras caractéristique de ces huiles. Celles-ci se différencient entre elles selon leur acide gras majoritaire : l'acide oléique pour l'huile d'olive et le colza par exemple, l'acide linoléique pour les autres.

En matière d'acides gras saturés, les huiles végétales citées ici en contiennent peu : en général de 8 à 15 %. Parmi les huiles végétales, les huiles à plus forte teneur en acides gras saturés (arachide ou palme) font exception.

Le rapport ω 6/ ω 3 des huiles varie évidemment en fonction de leur composition en acides linoléiques et α -linoléniques. Sur la base des recommandations nutritionnelles actuelles plaçant l'optimum de ce ratio aux environs de 5, les huiles du groupe α -linoléniques telle que l'huile de colza dont le ratio est de 2 à 3 par exemple sont particulièrement intéressantes pour leur contribution à équilibrer la ration lipidique (**Pagès, 2008**).

II.3.3 Teneur en d'autres nutriments : tocophérols, phytostérols, composés phénoliques, caroténoïdes.

a) Tocophérols

La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols (4 principaux : α , β , γ et δ) : l' α -tocophérol est le plus fréquent dans la nature et le plus actif biologiquement ; les β - et γ -tocophérols ont une activité vitaminique réduite (respectivement 30 et 15 % environ de l'activité de la forme α) ; le δ -tocophérol est pratiquement inactif. C'est pourquoi il est convenu d'exprimer la teneur en vitamine E en α -tocophérol équivalent (α -TE).

Au sein de l'organisme, l' α -tocophérol (vitamine E) est un puissant antioxydant qui s'oppose aux phénomènes oxydatifs, notamment à l'oxydation des acides gras. Il est capable de neutraliser les radicaux libres, jouant ainsi un rôle significatif de protection des membranes cellulaires (système nerveux, muscle, myocarde), des globules rouges

(longévité), des revêtements des vaisseaux sanguins, de la peau et des acides gras essentiels ou indispensables précurseurs des prostaglandines.

Parmi les sources alimentaires de tocophérols, les huiles végétales ont la première place et la plupart sont dites « naturellement riches » en cette vitamine puisque 100 kcal (soit 11 g) de ces huiles apportent plus de 1 mg de vitamine E : le tournesol figure parmi les plus riches (45 à 100 mg de vitamine E pour 100 g d'huile) **(Bruneton, 1993 ; Pagès , 2008)**.

b) Phytostérols

Toutes les huiles végétales contiennent des phytostérols (en moyenne de 0,1 à 0,5 %) qui présentent une analogie de structure avec le cholestérol. Cette propriété leur confère, quand ils sont apportés en quantité suffisante dans la ration alimentaire (2 à 3 g/j), un rôle hypocholestérolémiant car, vis-à-vis de l'absorption intestinale, ils entrent alors en compétition avec le cholestérol alimentaire, conduisant à une absorption moindre de ce dernier.

c) Composés phénoliques

Ces constituants, encore appelés « biophénols », sont des substances naturelles aux importantes propriétés antioxydantes, très présentes dans les huiles d'olive vierges comme le tyrosol et l'hydrotyrosol et leur précurseur l'oleuropeine. Cette fraction phénolique est responsable de la qualité gustative de l'huile ainsi que de sa stabilité **(Owen et al., 2000)**.

d) Caroténoïdes

Pigments lipophiles sensibles aux rayons ultraviolets et à la chaleur, les caroténoïdes et plus particulièrement le *trans-β*-carotène, sont des précurseurs de la vitamine A. Les huiles végétales non raffinées en contiennent en général de faibles quantités (≈ 10 mg/100 g). Les caroténoïdes sont en grande partie éliminés au cours du raffinage **(Pagès, 2008)**

II.4 Détermination des constituants majeurs et mineurs des huiles

II.4.1 Détermination des constituants majeurs

a) Triglycérides

Les triglycérides ou acylglycérols sont des esters d'acides gras et de glycérol. Ce sont les principaux constituants des corps gras (97 à 99 %). De ce fait, de très nombreuses études se sont penchées sur l'analyse des triglycérides (Ollé, 2002).

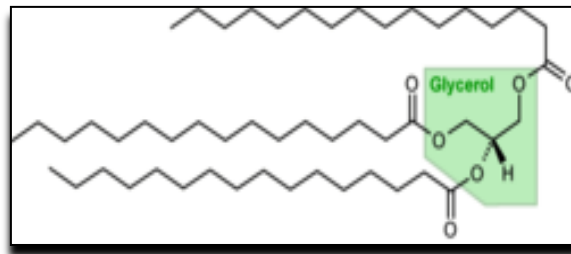


Figure 11 : Structure des triglycérides

Pendant très longtemps, l'analyse en fonction du degré d'insaturation fut une méthode complexe et délicate. Grâce à l'apparition des techniques chromatographiques vers 1950, les progrès dans l'analyse ont été considérables.

➤ *Analyse par chromatographie sur couche mince CCM*

Il est possible, en utilisant des couches minces de gel de silice imprégné de AgNO_3 , de séparer les triglycérides en fonction de leurs insaturations.

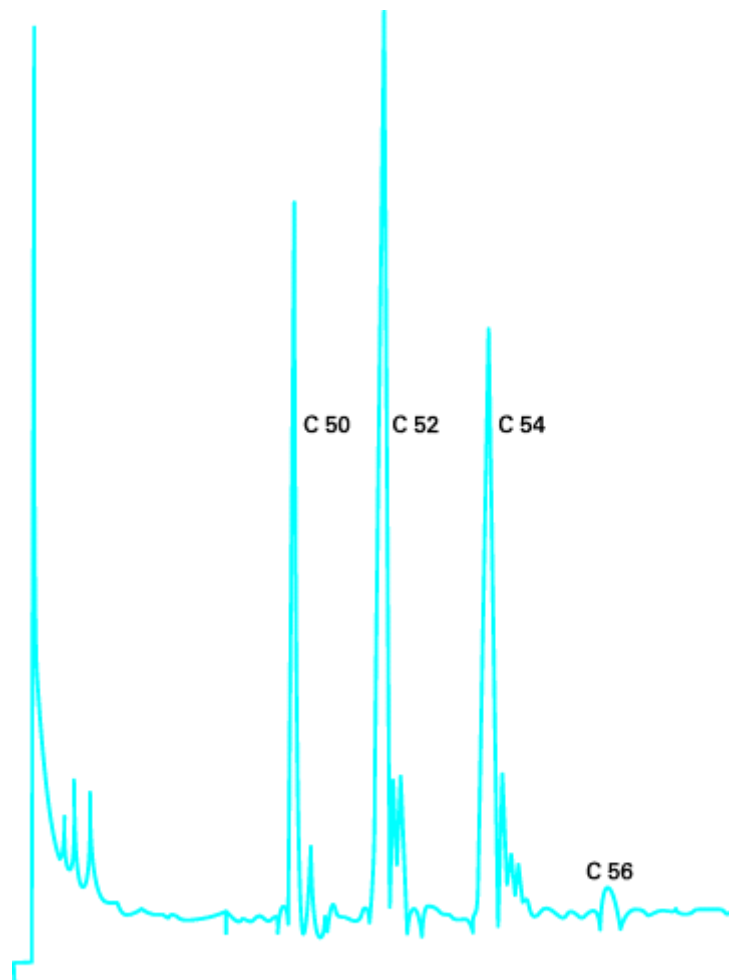
Cette méthode reste cependant d'une interprétation très délicate, de nombreux phénomènes intervenant au cours de la migration, et ne peut s'appliquer qu'à un nombre limité de corps gras (Ollé, 2002).

➤ *Analyse par chromatographie en phase gazeuse CPG*

Les triglycérides peuvent être analysés par CPG en utilisant des colonnes courtes imprégnées de phases stationnaires apolaires ou peu polaires de type silicone. Pendant longtemps, les triglycérides ont été élués et regroupés par nombre pair d'atomes de carbone exemple C54= SSS (tristéarine) ou OOO (tristéarine) ou LLL (trilinoléine) ou toutes les combinaisons entre les trois acides gras.

Les développements récents de la CPG sur colonne capillaire ont permis d'améliorer considérablement l'analyse des triglycérides (**Pons, 2004**).

Exemple : Sur la figures **12** est donnée le spectre CPG de triglycérides classés par poids moléculaires suivant la norme UICPA 2-323.



Colonne capillaire : diamètre 0,25 mm, phase stationnaire SE 30, longueur 10 m
Gaz vecteur : hydrogène 1,5 ml/min
Température : 340 à 370 °C, 5 °C/min

Figure 12 : Triglycérides de beurre de cacao par CPG

➤ *Analyse par chromatographie liquide CL*

Grâce aux plus récents développements de la chromatographie liquide et en particulier aux développements des supports greffés, l'analyse des triglycérides a fait d'importants progrès.

Pour l'analyse des triglycérides d'huiles en cours de recherche, trois huiles peuvent être utilisées comme standards externes telles l'huile d'olive, l'huile de colza et l'huile de soja (**Hachicha et al., 2007**).

Exemple : L'analyse par chromatographie liquide des triglycérides d'huile d'olive est donnée sur la figure **13**.

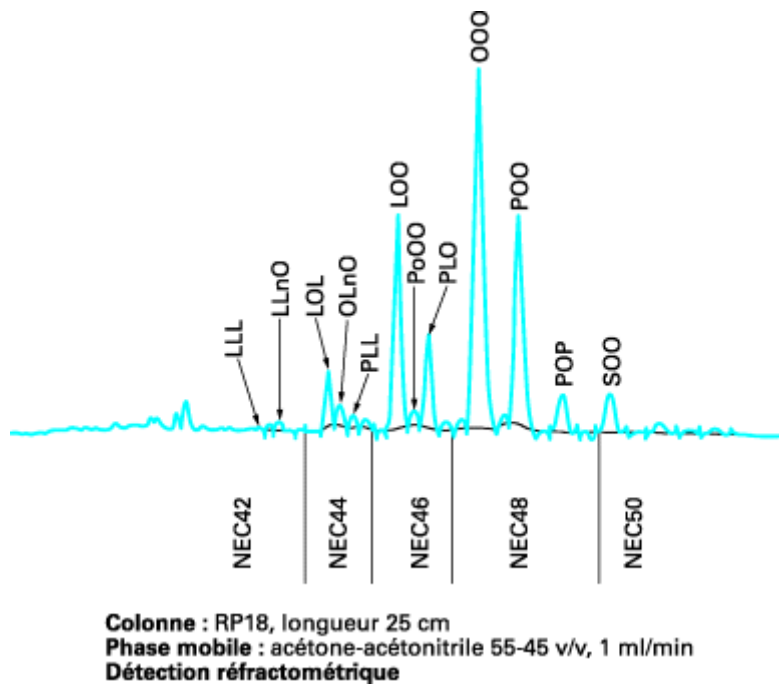


Figure 13 : Triglycérides d'huile d'olive par HPLC

Les triglycérides sont élués selon leur nombre de partition NP (ou nombre équivalent de carbone NEC) :

$$NEC = NC - 2n$$

avec :

- NC : nombre de carbone de triglycérides
- n : nombre de doubles liaisons.

Exemple

SSS (tristéarine) : NP = 54

OOO (trioléine) : NP = 54 - (2 × 3) = 48

LLL (trilinéoléine) : NP = 54 - (2 × 6) = 42

Une des difficultés des méthodes par chromatographie liquide reste l'identification des différents composés élués due, d'une part à leur grande diversité, d'autre part à la difficulté de se procurer des substances étalon (**Ollé, 2002**).

b) Acides gras

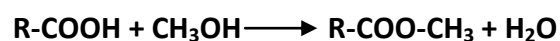
➤ *Préparation des esters méthyliques*

Les acides gras étant les constituants essentiels des triglycérides, c'est par leur connaissance que l'analyste peut déterminer les caractéristiques d'identité des corps gras, selon :

- la présence ou non de certains acides gras ;
- les proportions des acides gras entre eux.

Avant d'analyser la composition des acides gras libres d'un échantillon, il faut libérer ceux qui sont impliqués dans la formation de lipides plus complexes par saponification (triglycérides, phospholipides, glycosphingolipides, etc...).

La plupart des études de structure des acides gras, faisant appel à l'analyse de FAMES (« Fatty acids » méthylés), demande après saponification une estérification des acides gras libres, ce qui allonge les temps d'analyses (**Eder, 1995 ; Pons, 2004**). Afin d'éviter de procéder successivement à une saponification puis à une estérification, la trans-estérification peut être effectuée directement en une seule étape et avec un seul réactif (**Morrison et Smith, 1965 ; Gutnikov, 1995 ; Eder, 1995 ; Ruiz-Gutiérrez et Barron, 1995**).



Les acides gras sont ainsi rendus volatils, ce qui les rend facilement détectables en chromatographie en phase gazeuse (Voir Figure 14).

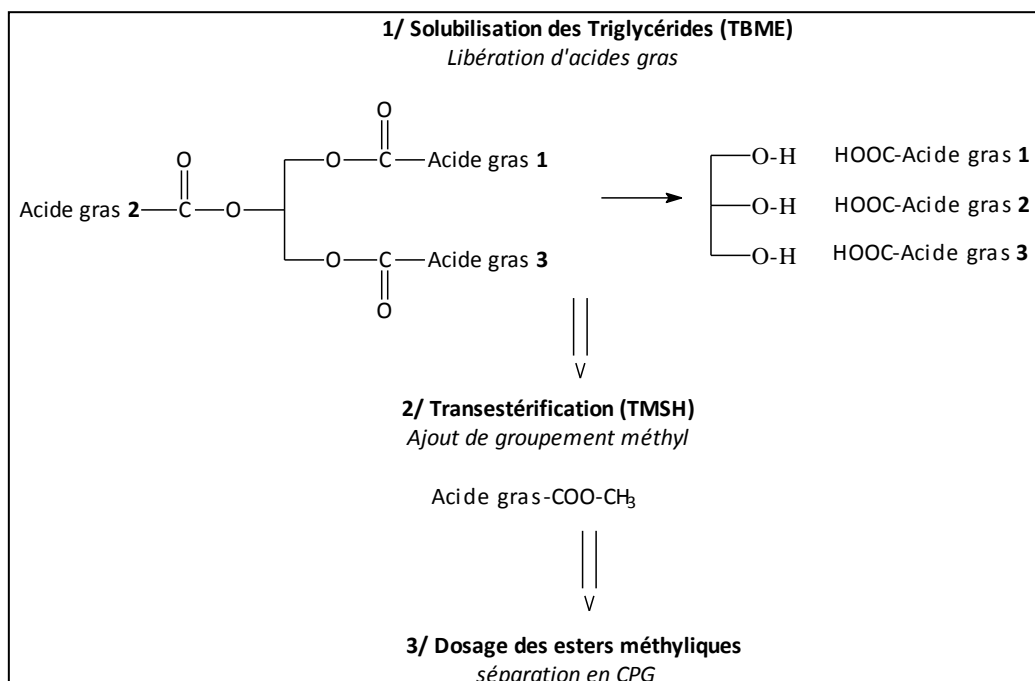


Figure 14 : Les trois étapes nécessaires au dosage des acides gras

Méthodes applicables aux corps gras acides et acides gras :

Les techniques de préparation des esters méthyliques sont relativement nombreuses. Nous ne citerons que les méthodes les plus utilisées :

- **Méthode au triméthylhydroxysulfonium TMSH $(\text{CH}_3)_3\text{S}^+\text{OH}^-$** : en présence de TMSH, les triglycérides sont estérifiés au moment où ils pénètrent dans l'injecteur du système chromatographique (250°C).
- **Méthode générale au trifluorure de bore BF_3** : le corps gras est dans un premier temps saponifié en présence de potasse méthanolique 0,5 N. L'estérification est ensuite réalisée en présence de BF_3 /méthanol (réactif prêt à l'emploi dans le commerce). Après addition d'eau, les esters sont récupérés à l'aide d'un solvant.

- **Méthode applicable aux corps gras neutres (ou ayant une faible acidité)** : la réaction s'effectue à chaud en présence de potasse méthanolique environ 1N, les esters étant récupérés par un solvant (pentane, hexane) après addition d'eau.
- **Méthode à froid (corps gras à chaînes courtes)** : dans le cas des corps gras possédant des chaînes courtes (acide butyrique), il est nécessaire d'opérer à froid. Dans un tube ou une ampoule fermé, on solubilise les triglycérides dans le pentane, puis on les estérifie par de la potasse méthanolique environ 2N par agitation.
- **Estérification en milieu acide** : il est possible d'obtenir des esters en milieu H_2SO_4 /alcool, en ampoule scellée, à chaud (bain-marie) (**Ollé, 2002**).

➤ *Analyse des acides gras et esters d'acides gras par CPG*

Les progrès réalisés en CPG au cours des vingt dernières années ont très nettement amélioré l'analyse des corps gras.

Les différents constituants sont retenus en fonction :

- du nombre d'atomes de carbone ;
- des insaturations de chaîne dans une même famille: les doubles liaisons polaires étant retenues. Ainsi, pour la famille C18, les différents composés seront élués dans l'ordre :

**C₁₈:0 (Acide stéarique)- C₁₈:1 Cis Δ9 (Acide oléique)- C₁₈:2 Cis Δ9, 12 (Acide linoléique)-
C₁₈:3 Cis Δ9, 12 , 15 (Acide linoléique).**

Il est possible pour un même composé de séparer de nombreux isomères : isomères de position des doubles liaisons ou bien isomères de configuration (formes cis et trans):

C₁₈:1 Cis Δ9 C₁₈:1 Cis Δ11

La principale difficulté de l'analyse par CPG réside dans l'identification des composés élués.

Les différents acides gras sont élués selon **la loi de Kovats** :

$$\log tr = an + b$$

avec :

- tr : distance de rétention
- n : nombre de carbone de la chaîne
- b : ordonnée à l'origine
- a : pente.

Il est aussi possible d'utiliser des composés connus soit des corps gras dont la composition est bien connue, soit des matériaux de référence (certifiés) permettant de faire à la fois les analyses qualitatives et quantitatives (**Ollé, 2002 ; Pons, 2004**).

➤ *Analyse des acides gras par HPLC*

Les lipides peuvent être analysés en HPLC sous différentes formes :

- sous forme d'acides gras, après saponification puis acidification et extraction ;
- sous forme dérivée : esters méthyliques ou esters phénylacétiques.

L'analyse peut être réalisée soit par chromatographie d'adsorption sur colonne de silice traitée au nitrate d'argent (5 à 20 %), la phase mobile pouvant être le benzène ou bien un mélange acétone-acétonitrile, soit par chromatographie de partage en phases inverses : les colonnes les plus utilisées sont de type octadécyl, les éluants du type acétonitrile-eau (70-30 v/v) ou méthanol-eau (95-5 v/v).

c) Phospholipides

Les phospholipides forment des mélanges complexes présents dans la plupart des matières grasses végétales ou animales. Les teneurs sont très variables (de quelques milligrammes par kg à des grammes par kg). Ils peuvent être dosés par diverses méthodes comme par exemple par le dosage du phosphore (Ollé, 2002).

II.4.2 Détermination des constituants mineurs

La fraction insaponifiable ne représente généralement que 0,5 à 2 % des corps gras. Alors que la fraction saponifiable ne contient que des triglycérides, la fraction insaponifiable est composée de différents groupes, chaque groupe ayant un nombre plus ou moins important de constituants.

La première étape de toute analyse sera le fractionnement de l'insaponifiable afin de pouvoir isoler chaque famille.

a) Fractionnement de l'insaponifiable

Après saponification du corps gras, la fraction insaponifiable peut être extraite (à l'aide d'hexane ou d'oxyde diéthylique) puis pesée après séchage.

Le fractionnement s'effectue généralement par CCM sur plaque de silice, de nombreux systèmes éluant pouvant être utilisés : chloroforme-oxyde diéthylique (80-20 v/v), hexane-oxyde diéthylique (70-30 v/v), hexane-acétate d'éthyle (80-20 v/v). L'élution est réalisée par polarité décroissante, R_f hydrocarbures : 0,97, R_f stérols 0,25. La révélation est effectuée par pulvérisation de dichloro-2,7-difluorescéine ou de rhodamine B.

L'échantillon ayant été déposé sous forme d'une bande occupant toute la largeur de la plaque, les bandes peuvent être récupérées par grattage correspondant aux différents groupes (Voir figure 15).

Les différents constituants sont ensuite extraits de la silice par solubilisation à chaud dans un solvant (chloroforme, oxyde diéthylique, dichlorométhane) puis filtration et séchage.

Une méthode récente permet, particulièrement en vue de l'analyse des stérols, de fractionner l'insaponifiable par HPLC sur colonne de gel de silice, éluant hexane-isopropanol (99-1 v/v), détecteur réfractométrique. Les composés élués sont récupérés à l'aide d'un collecteur de fractions.

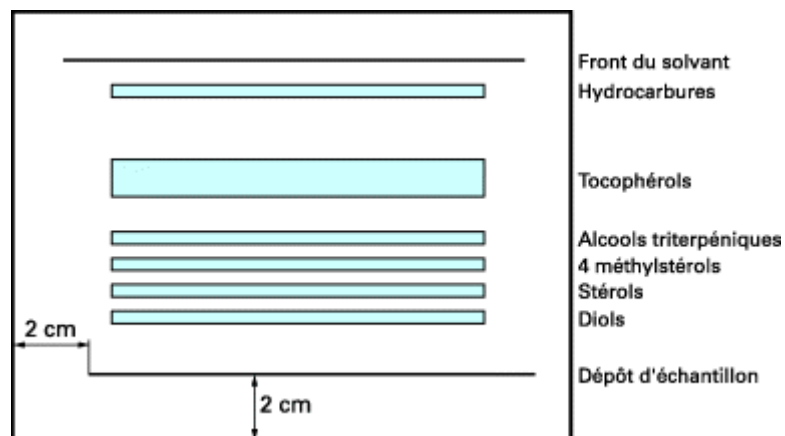


Figure 15 : Fractionnement des composés insaponifiables par CCM

b) Fraction stérolique

Les stérols sont analysés par CPG sous forme dérivée :

- de triméthylsilyléther (TMS) obtenus à l'aide de réactifs silylants anhydres ;
- d'acétates obtenus par microacétylation par le mélange pyridine–anhydride acétique (50-50 v/v).

Les différents stérols sont identifiés par le temps de rétention relatif exprimé par rapport au β sitostérol, composé généralement majeur dans les huiles et graisses végétales.

Exemple : Analyse de l'huile de Tournesol (figure **16**) (NF ISO 6799) :

cholesterol 0,63

cholestanol 0,64

brassicastérol 0,71

campestérol 0,81

stigmastérol 0,87

$\Delta 7$ campestérol 0,92

β sitostérol 1,00

$\Delta 5$ avenastérol 1,03

$\Delta 7$ stigmastérol 1,12

$\Delta 7$ avenastérol 1,16

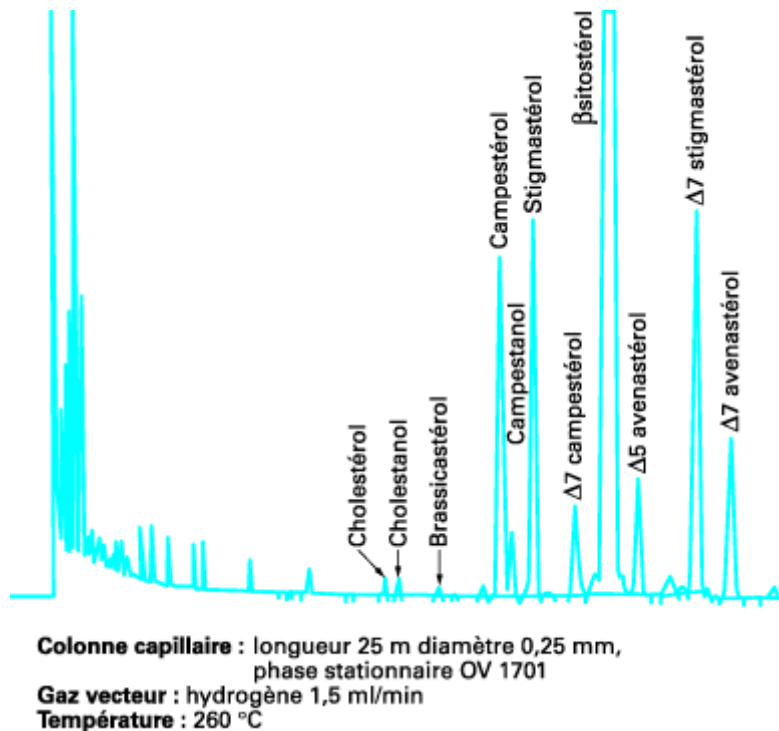


Figure 16 : Stérols d'huile de tournesol par CPG

c) Alcools triterpéniques

Les alcools triterpéniques, les méthylstérols, sont séparés par CCM lors du fractionnement de l'insaponifiable (R_f légèrement supérieur à celui des stérols). Après grattage de la bande, extraction des constituants, ceux-ci sont dérivés en triméthylsilyléthers ou acétates, puis analysés en CPG dans les conditions voisines de celles de l'analyse des stérols.

Certains alcools (erythrodiol et uvaol) peuvent présenter un grand intérêt dans la caractérisation de certaines huiles alimentaires (grignon d'olive, pépins de raisin).

d) Tocophérols

Les tocophérols sont des composés possédant à la fois une activité vitaminique et une activité antioxydante. Alors que l'activité vitaminique décroît de l' α -tocophérol au δ -tocophérol, l'activité antioxydante croît de l' α -tocophérol au δ -tocophérol.

Les tocophérols peuvent être obtenus après fractionnement de l'insaponifiable, mais, du fait de leur oxydabilité, il est nécessaire de les protéger : saponification à froid ou à chaud, mais de courte durée et en présence de pyrogallol.

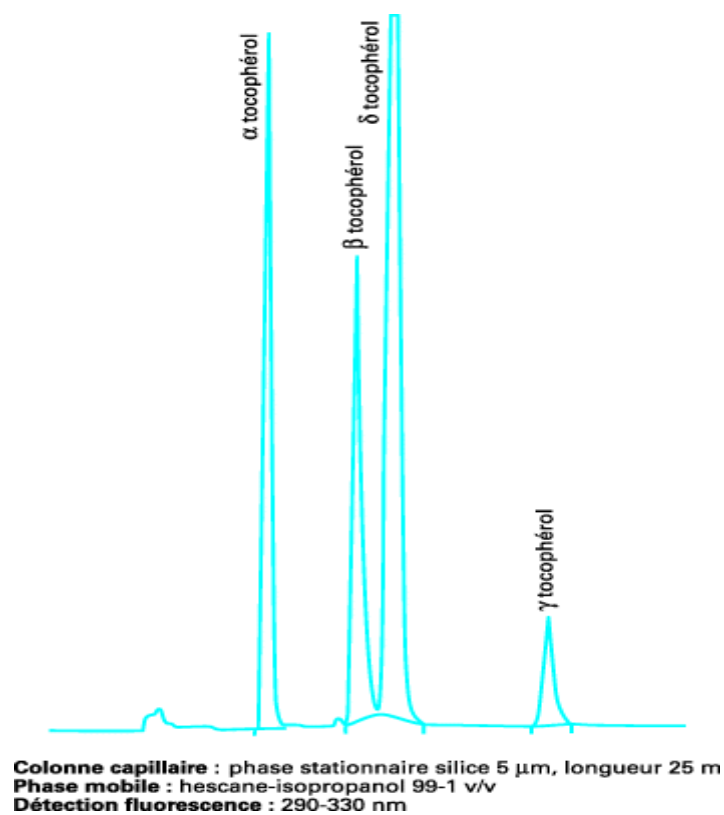


Figure 17 : Tocophérols par HPLC

Les tocophérols, comme les autres constituants de l'insaponifiable, présentent un profil caractéristique pour chaque corps gras.

e) Colorants

Les colorants naturels des corps gras sont essentiellement des caroténoïdes et des chlorophylles.

Les caroténoïdes sont analysés à partir de la fraction insaponifiable en HPLC à polarité de phase inversée (éluant méthanol-chloroforme 90-10 v/v) avec détecteur UV/visible à barrette de diodes.

Les chlorophylles sont aussi caractérisées par HPLC sur colonne de silice avec éluant hexane-isopropanol (98,5-1,5 v/v) par la méthode officielle FOSFA (*Federation of Oils, Seeds and Fats Associations*).

f) Vitamines

La détermination de la teneur en vitamine A s'effectue par HPLC de la même manière que pour le carotène.

Pour les vitamines D, après saponification à froid et extraction de la fraction insaponifiable, le dosage est réalisé par double chromatographie liquide : une première chromatographie sur une colonne de silice, récupération de la fraction contenant les vitamines, puis une deuxième chromatographie de cette fraction sur une colonne octadécyl et quantification par étalonnage externe (**Ollé, 2002**).

III.L'huile de coloquinte

Au Nigeria et dans certains pays d'Afrique de l'ouest, la coloquinte est cultivée seulement pour ses graines afin de produire de l'huile. Cette huile est utilisée pour les fritures et les préparations culinaires (**El-Magoli et al., 1979 ; Casimir, 1992**). Elle peut même être utilisée pour le traitement des morsures de serpent, les piqûres de scorpions, la dysenterie, la diarrhée, l'épilepsie, la poussée et le noircissement des cheveux (**Panda, 2000**). L'huile de graine de coloquinte peut aussi avoir un effet hypoglycémiant (**Chabane Sari et al., 2007**).

Cette huile contient une bonne quantité d'acide linoléique (C18 :2) qui est un acide gras essentiel et une petite teneur en acide linoléique (C18 :3) (**Akoh et al. 1992 ; Huang et al., 1994 ; Udayasekhara Rao, 1994**).

Les analyses faites par chromatographie en phase gazeuse ont montré que l'huile de *Citrullus colocynthis* contient 76,4% d'acide linoléique, 8,1% d'acide palmitique, 7,8% d'acide oléique, 6,1% d'acide stéarique et 0,5 d'acide linoléique (**Sebbagh et al., 2009**).

Concernant la qualité de l'huile, l'indice de peroxyde a été décelé relativement bas qui reste dans les limites acceptables fixées pour les huiles végétales comestibles (**sawaya et al., 2006 ; Zohara, 1999**).

Quant à l'insaponifiable qui est la partie non glycéridique de l'huile et, qui renferme un mélange d'hydrocarbures, d'aldéhydes, de cétones, de pigments et de vitamines liposolubles représente de 1% à 2.15% de l'huile (**badifu 1991 ; sawaya et al., 2006**).

Une étude chromatographique faite sur cet insaponifiable a révélé qu'il est composé de phytostérols dont le composant majoritaire, comme dans la plupart des huiles végétales, est le β -sitostérol (60 à 65%) suivi par le stigamstérol (19 à 20%) et le campesterol (10 à 11%)le fucostérol, puis avec un pourcentage plus bas le β -sitosteryl acétate et campesteryl acétate (2 à 4%) et des traces de α -tocophérols et de β -carotène (**Badifu, 1991**).

Toutes les huiles végétales peuvent être sujettes de la détérioration de leur qualité due au rancissement, résultant de l'oxydation des doubles liaisons des triglycérides. Les antioxydants gagnent de l'importance dans l'industrie agro-alimentaire comme stabilisants des lipides, et dans la médecine préventive comme supprimeurs de l'oxydation excessive responsable du cancer et du vieillissement.

Les dernières recherches se sont concentrées sur l'isolation et la caractérisation des antioxydants dans les huiles végétales. Ils peuvent être :

- ❖ Piégeurs des radicaux libres
- ❖ Agents réducteurs
- ❖ Complexants des métaux pro-oxydants
- ❖ Inhibiteurs de la formation du singlet d'oxygène

Parmi les molécules antioxydantes présentes dans les huiles végétales et entre autres l'huile de coloquinte :

- Le tocophérol appelé aussi la vitamine E est un nutriment important et un bon antioxydant ; il améliore la stabilité de l'huile.
- Les polyphénols ont beaucoup d'influence sur la qualité sensorielle et nutritionnelle du produit et peuvent même prévenir la détérioration en piégeant les radicaux libres responsables du rancissement des lipides.
- Les phytostérols, cités ci-dessus sont hypocholestérolémiant, ont une activité antioxydante qui induit la formation d'un radical libre allylique dont l'isomérisation à d'autres radicaux libres les rendent relativement stables.

Par ailleurs, quelques activités antioxydantes élevées de certaines huiles brutes et partiellement raffinées sont dues aux lipides polaires et spécialement les phospholipides qui sont considérés comme de bons piégeurs de radicaux libres, des antioxydants synergiques et amplificateurs de la première réaction des antioxydants. Les phospholipides sont aussi des agents émulsifiants et peuvent jouer un rôle important dans l'augmentation du contact entre les antioxydants et les acides gras sujets de l'oxydation (**Ramadan et Moersel, 2006**).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

I. Extraction de l'huile de coloquinte

I.1. Matériel végétal

La récolte de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) étudiée au niveau de notre laboratoire a été effectuée du mois d'octobre au mois de décembre dans la région de Mécheria au sud ouest algérien.

Une fois au laboratoire, les graines sont séparées après maturité du fruit. Les graines de couleur marron sont lavées puis séchées à l'air libre.

I.2. Extraction de l'huile

L'extraction de l'huile de coloquinte a été réalisée par l'extracteur de Soxhlet avec un solvant polaire tel que l'éther de pétrole sur une matrice solide qui est le broyat des graines.

Les graines séchées sont broyées dans un broyeur à mortier type Retsch RS100 ; 15 grammes de broyat sont pesés dans une cartouche d'extraction bouchée avec du coton dégraissé et disposée dans l'appareil d'extraction.

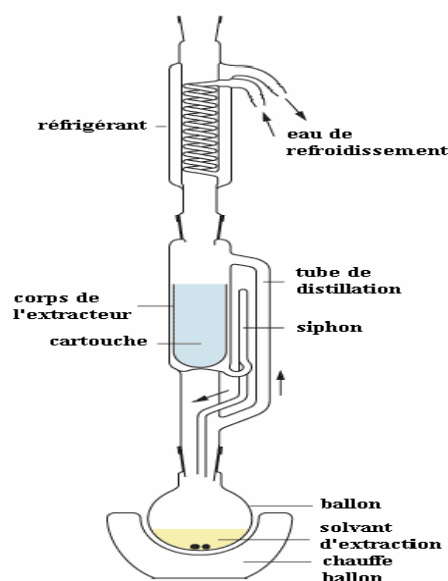


Figure 18 : Extracteur Soxhlet

La quantité totale du solvant ajoutée doit être de une et demi à deux fois la capacité du réservoir à siphon d'extraction de l'appareil.

L'avantage dans ce procédé est que le solvant condensé s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute (**Haidara, 1996**).

Les extractions se sont déroulées sur 4, 6 et 8 heures et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la matière initiale après pesée d'un ballon, préalablement taré, ayant subi une évaporation du solvant.

L'inconvénient dans cette méthode est qu'elle est longue et peu économique en solvant.

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$Rdt = \frac{m_0}{m_1} \times 100$$

Où :

m_0 : Masse en grammes de l'huile évaporée

m_1 : Masse en grammes de la prise d'essai (les graines broyées).

II. Analyses physico-chimiques de l'huile de coloquinte

II.1. Densité relative à 20°C : (NF ISO 6883)

La densité relative d'une huile est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C.

La densité relative est mesurée par une suite de pesées à l'aide d'un pycnomètre.

Après nettoyage et séchage du pycnomètre, il a été pesé et rempli d'eau distillée récemment bouillie et refroidie puis plongé dans un bain d'eau jusqu'à ce que l'eau atteigne une température de 20°C.

Le pycnomètre a été retiré, essuyé extérieurement et pesé.

La même procédure est suivie pour l'huile en remplissant le pycnomètre par le même volume d'huile puis placé dans le bain d'eau pour qu'elle atteigne les 20°C. Ensuite, le pycnomètre est essuyé et pesé.

La densité relative se détermine :

$$D^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : masse du pycnomètre vide,

m_1 : masse du pycnomètre rempli d'eau distillée,

m_2 : masse du pycnomètre rempli d'huile,

II.2. Indice de réfraction à 20°C:(ISO 6320)

L'indice de réfraction est mesuré à l'aide de réfractomètre, de type Abbe, thermostaté. Il est lié à la température. Il est mesuré à 20 °C pour les huiles fluides et à 40°C pour les graisses (**Ollé, 2002**).

Cet indice est déterminé à l'aide d'une lampe à vapeur de sodium, à la longueur d'onde de 589 nm et à 20°C.

L'indice de réfraction des huiles varie en fonction de leurs insaturations. L'indice de réfraction croît avec le degré d'insaturation des acides gras contenus dans les matières grasses. Il permet de différencier l'appartenance du corps gras aux deux groupes suivants :

- Graisses lauriques végétales (R =1,448 à 1,458) ou animales (R=1,471 à 1,458)
- Huiles végétales (R =1,468 à 1,490) ou animales (R=1,471 à 1,485)

Cependant, il autorise le suivi des opérations d'hydrogénation et de fractionnement des corps gras (**Adrian et al., 1998**).

La surface du prisme du réfractomètre est nettoyée et essuyée avec du papier Joseph et, après étalonnage avec de l'eau distillée à 20°C, quelques gouttes d'huiles de coloquinte sont déposées sur le prisme.

La fenêtre de lecture donne directement la valeur de l'indice de réfraction à la température «t°» en degré Celsius.

Afin de ramener la valeur de cet indice de réfraction mesuré pour un liquide à une température t, à la valeur référencée à T=20°C, on peut utiliser une relation affine valable pour de faibles écarts de température :

Si la différence entre la température de mesurage t et la température de référence T est inférieure à 3°C, l'indice de réfraction N_D^t à la température de référence T est donnée par la formule:

$$\text{a) Si } t > T \quad N_D^T = N_D^t + (t-T) \times F$$

$$\text{b) Si } t < T \quad N_D^T = N_D^t + (T-t) \times F$$

t : température de la détermination

T : température de référence qui est 20°C pour les huiles.

F : facteur de correction, fonction de la température, égal à 0.00035 pour T= 20°C, pour les huiles;

N_D^t : l'indice de réfraction pris sur le réfractomètre.

II.3. Indice d'acide :(NF EN ISO 660)

L'hydrolyse des corps gras, qu'elle soit d'origine chimique (présence d'eau) ou enzymatique par les enzymes lipolytiques (palme, karité, olive) entraîne la formation d'acides gras libres.

L'acidité oléique d'une huile représente le pourcentage des acides gras libres (=FFA pour *free fatty acids*) exprimé conventionnellement en acide oléique pour les huiles végétales (Ollé, 2002).

Il s'exprime par le nombre de mg d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser l'acidité grasse présente dans 1g de lipides (Adrian *et al.*, 1998).

Cet indice indique le degré d'altération des esters (essentiellement des triglycérides) présents dans le corps gras.

Après avoir pesé exactement 0,5 g d'huile dans un erlenmeyer de 250 ml. On les dissout avec 100 ml d'éthanol 95% /oxyde d'éthyle (50-50 v/v). On dose avec une solution de KOH éthanolique de normalité 0,5 N après avoir ajouté 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine jusqu'à coloration rose persistant.

Pour les calculs :

$$\text{Acidité (\%)} = \frac{V \times C \times M}{10 \times m}$$

$$\text{IA (\%)} = \frac{56.1 \times V \times C}{m}$$

56,1: est la masse molaire (g/moles) de l'hydroxyde de potassium,

V : est le volume (ml) d'hydroxyde de potassium utilisé,

C : est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée,

m : est la masse en grammes de la prise d'essai.

M : 282 pour l'acide oléique.

II.4. Indice de saponification : (NF ISO 3657)

Si la détermination de l'indice de saponification est une opération caractéristique de l'analyse des lipides, elle est destinée essentiellement aux contrôles industriels (savonnerie). Elle consiste à transformer en savons solubles (sodiques ou potassiques) la totalité des acides gras présents à l'état estérifié dans une matière grasse et à régénérer le glycérol dans le cas des triglycérides (**Adrian et al., 1998**).

L'indice de saponification ou *indice de Koettstoerfer* est la masse en milligrammes de potasse nécessaires pour saponifier 1 g de corps gras. En effet, plus les molécules d'acides ont d'atomes de carbone, moins l'indice de saponification est élevé. Il rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras. (**Ollé, 2002 ; Salgarolo, 2003**).

La réaction de *saponification* est complète, irréversible et rapide. Elle est à différencier de la réaction d'*estérification* qui est incomplète, réversible et lente.



2g d'huile sont dissous dans une solution de KOH (0,5N) dans l'éthanol, sont introduits dans un ballon à col rodé. Le ballon est connecté à un réfrigérant à reflux et porté à ébullition durant au moins 60 minutes, en agitant de temps en temps.

L'excès de KOH est titré par une solution d'acide chlorhydrique HCL (0,5N), en présence de phénolphtaléine.

Un **essai à blanc** est préparé en suivant le même mode opératoire.

L'indice de saponification (IS) se détermine ainsi :

$$\text{IS} = \frac{(\text{V}_0 - \text{V}_1) \times \text{C} \times 56.1}{m}$$

V_0 : est le volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer le blanc

V_1 : est le volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer l'essai.

C : est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'acide chlorhydrique utilisée,

m : est la masse (g) de la prise d'essai.

II.5. Indice de peroxyde : (NF T 60-220 et ISO 3960)

L'indice de peroxyde (encore appelé indice de *Léa*) est recherché pour évaluer l'état de conservation d'une matière grasse au cours du stockage. En effet les corps gras peuvent s'oxyder en présence d'oxygène et de certains facteurs favorisant (UV, eau, enzyme, trace de métaux,...) (Cheftel et al., 1984).

Les premiers composés formés au cours de l'oxydation sont les peroxydes ou les hydroperoxydes. Ceux-ci vont ensuite évoluer vers des composés plus stables : aldéhydes, cétones, acides.

L'indice de peroxyde est le nombre de microgrammes d'oxygène actif contenus dans un gramme de corps gras et susceptibles d'oxyder l'iodure de potassium. Il est exprimé en microgrammes par gramme ou plus souvent en milliéquivalent d'oxygène actif par kilogramme.

Cet indice permet d'apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative de l'huile (Ollé, 2002).

Environ 5 g de matière grasse sont dissous dans 10 ml de chloroforme, 15 ml d'acide acétique et 1 ml d'iodure de potassium saturé. L'erlen contenant ce mélange est fermé avec un bouchon et laissé pendant exactement 5 minutes à l'abri de la lumière.

L'iode libéré est titré avec une solution de thiosulfate de sodium (0,02N) après avoir ajouté 75 ml d'eau distillée, en utilisant l'empois d'amidon comme indicateur coloré.

Un **essai à blanc** est préparé en suivant le même mode opératoire.

L'indice de peroxyde (IP) s'effectue de la manière suivante :

$$IP = \frac{(V_1 - V_0) \times C}{m} \times 100$$

V_0 : est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour l'essai à blanc;

V_1 : est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour la détermination;

C : est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisée.

m : est la masse (g) de la prise d'essai.

II.6. Indice d'iode :(NF ISO 3961)

L'indice d'iode appelé aussi *indice de Hübl*, est la masse en grammes d'iode fixé sur les doubles liaisons présentes dans 100 g de corps gras (**Salgarolo, 2003**).

La méthode de Wijs est certainement la plus utilisée (possibilité de trouver dans le commerce du réactif prêt à l'emploi) (**Ollé, 2002**).

Le dosage consiste à faire réagir une solution halogénante, 25 ml de réactif de Wijs sur une masse d'échantillon de 0,2 à 0,3g préalablement dissous dans 15 ml de tétrachlorure de carbone.

L'erien contenant la solution est bouché hermétiquement et placé dans un endroit sombre pendant une heure après l'avoir agité fortement. On ajoute ensuite 20 ml d'iodure de potassium (KI) à 10% et 150 ml d'eau distillée afin d'extraire l'iode en excès dans la phase aqueuse.

On titre par le thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3$, 0,1N en présence d'empois d'amidon et cela jusqu'à décoloration complète des deux phases (**Salgarolo, 2003**).

La réaction peut être accélérée par l'emploi d'un catalyseur, l'acétate mercurique dans l'acide acétique (**Guillemin, 2006**).

Un **essai à blanc** est préparé en suivant le même mode opératoire.

L'indice d'iode se détermine de la manière suivante :

$$I = \frac{((V_0 - V) \times C \times 12,69)}{m}$$

V_0 : est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour l'essai à blanc;

V_1 : est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour la détermination;

C : est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisée.

m : est la masse (g) de la prise d'essai.

II.7. Mesure de la teneur en insaponifiable : NFT 60-205

L'insaponifiable est constitué par l'ensemble des composés extractibles par les solvants organiques (hexane, éther éthylique) directement après traitement du corps gras par la potasse alcoolique.

Après saponification du corps gras, la fraction insaponifiable peut être extraite (à l'aide d'hexane ou d'oxyde diéthylique) puis pesée après séchage.

On entend par matières insaponifiables d'un corps gras, l'ensemble des produits présents dans ce corps gras qui, après saponification de celui-ci par hydroxyde alcalin, extraction par un solvant spécifié et élimination de ce dernier, restent non volatils dans les conditions opératoires décrites dans la norme NF T60-205 Nou :1975.

Cet ensemble est formé des constituants naturels des matières grasses tels les stérols, les alcools aliphatiques supérieurs, les pigments, les hydrocarbures, ainsi que les substances organiques étrangères non volatiles à 103 °C.

Le principe est basé sur la saponification du corps gras par traitement à l'ébullition à reflux avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, extraction de

l'insaponifiable de la solution de savon au moyen d'un solvant spécifié, évaporation du solvant et pesée du résidu après séchage à 103°C.

Dans un ballon muni d'un réfrigérant, 10 grammes d'huile sont saponifiés avec KOH 2N éthanolique et portés à ébullition pendant 1 heure. Tout de suite 100 ml d'eau sont ajoutés. Cette solution est transvasée dans une ampoule à décanter et le ballon est rincé avec 30 ml d'hexane ; le tout est agité énergiquement et abandonné au repos pendant quelques minutes.

La phase savonneuse est soutirée dans une seconde ampoule ; cette opération doit être répétée deux autres fois avec à chaque fois environ 30 ml d'hexane.

Les extraits sont retirés dans la deuxième ampoule et sont lavés avec 100ml de mélange eau/éthanol (v/v) à trois reprises en agitant vigoureusement et en éliminant la couche hydroalcoolique après chaque lavage. Il faut vérifier avec la phénolphtaléine que le liquide de lavage ne vire plus au rose.

La solution qui reste dans l'ampoule est transvasée dans un ballon séché et taré pour subir une évaporation à l'évaporateur rotatif. Le ballon est pesé.

La teneur en insaponifiable se calcule ainsi :

$$\text{Ins} = \frac{m_1 \times 100}{m_0}$$

m_1 : masse du résidu séché en grammes

m_2 : masse en grammes de la prise d'essai.

Remarque

Toutes les analyses ont été répétées trois fois (ou plus, comme pour l'indice d'iode) et toutes les solutions étaient étalonnées avant analyse.

III. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de coloquinte

III.1 Evaluation de l'activité antibactérienne

III.1.1 Souches utilisées

Les souches qui ont été testées pour déceler l'activité antibactérienne de l'huile de coloquinte sont des souches de référence fournies par « *le laboratoire antibiotiques, antifongiques* » sauf pour le *Bacillus cereus* qui est une souche disponible au niveau de notre laboratoire.

Deux souches à Gram négatif : (ATCC : American type of culture collection)

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Trois souches à Gram positif

Bacillus cereus ATCC 11778

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Enterococcus faecalis ATCC 29212

III.1.2 Isolement et purification

Les souches sont repiquées sur le bouillon nutritif et mises à l'étuve à 37°C/24heures puisensemencées sur une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive pour *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*, Mac Conkey pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, et Chapman pour *Staphylococcus aureus*. Toutes ces cultures sont incubées à 37°/24heures.

Un repiquage successif sur bouillon nutritif et sur gélose nutritive est effectué en prenant soin de prendre à chaque fois une colonie distincte et isolée.

La purification est suivie par l'étape d'identification par un examen de la morphologie, la coloration de Gram et les tests biochimiques.

III.1.3 Activité antibactérienne

VI.1.3.1 Milieux de culture utilisés

Les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- Bouillon nutritif
- Gélose nutritive
- Gélose de Mueller Hinton (milieu de référence pour les tests antibactériens)

Ces milieux ont été préparés et stérilisés (voir annexe II).

VI.1.3.2 Inoculum

Les cinq souches bactériennes purifiées sont mises en culture séparément à 37°C/24 heures sur un bouillon nutritif puisensemencées sur une gélose nutritive à 37°C/24h.

L'étape suivante vise à préparer l'inoculum en prélevant une à deux colonies et les suspendre dans 9 ml d'eau physiologique stérile (9g NaCl/l).

La densité de l'inoculum est fixée entre 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm correspondant au standard 0,5-McFarland équivalent à 10⁸UFC/ml.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture si la DO est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile si elle est trop forte (**Aboun et al., 2001, Abi-ayad, 2009**).

L'inoculum ainsi préparé est ensuite dilué au 1/100^e dans l'eau physiologique donnant une densité bactérienne de 10⁶ UFC/ml. Pour les staphylocoques, l'inoculum est ajusté à 10⁷ UFC/ml (la technique de diffusions) (**Soussy, 2003**).

Les techniques utilisées pour étudier l'effet des huiles de coloquinte sont celles de la diffusion des disques sur gélose (contact indirect) et des dilutions sur milieu solide (contact direct).

VI.1.3.3 Méthode de diffusion des disques (contact indirect)

Cette méthode suit le même principe de l'antibiogramme décrit par Kirby-Bauer (1960) et standardisée par le comité national des normes pour laboratoires cliniques (**Prescott et al., 2003 ; NCCLS, 2003**). Elle peut prévoir avec certitude l'efficacité *in vivo* du produit en question.

Elle est basée sur la diffusion des substances à tester imprégnées sur des disques en papier qui doivent être déposés à la surface d'un milieu solide ensemencé. Il se forme alors un gradient de concentrations autour du disque de papier et la croissance bactérienne est bloquée jusqu'au diamètre où les concentrations du gradient sont égales ou supérieures à la CMI (**Rey, 2010**).

Tandis que le mécanisme de diffusion se produit, la multiplication des germes ensemencés à la surface de la gélose intervient. Au moment où se manifeste la phase logarithmique de croissance, les bactéries se multiplient rapidement que la diffusion du produit ne peut progresser et les cellules bactériennes non inhibées continuent à se multiplier jusqu'à ce que la culture puisse être visualisée.

➤ *Tests antibactériens de l'huile*

Après préparation et stérilisation du milieu Mueller Hinton, 20 ml du milieu sont coulés dans des boîtes de pétri de 90mm de diamètre et l'épaisseur doit être impérativement de 4 mm. Le milieu est laissé se solidifier sur une surface froide dans des conditions aseptiques. Il faut éviter que des gouttelettes d'eau se forment à la surface de la gélose, phénomène pouvant altérer les qualités de diffusibilité du milieu.

Des disques en papier filtre Whatman stériles de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 1µl, 2µl, 3µl, 4µl, 5µl et 10µl d'huile de coloquinte et sont appliqués sur le milieu Mueller Hinton ensemencé par écouvillonnage en stries sur toute la surface du milieu en 3 reprises en faisant tourner la boîte de pétri de 60° après chaque application.

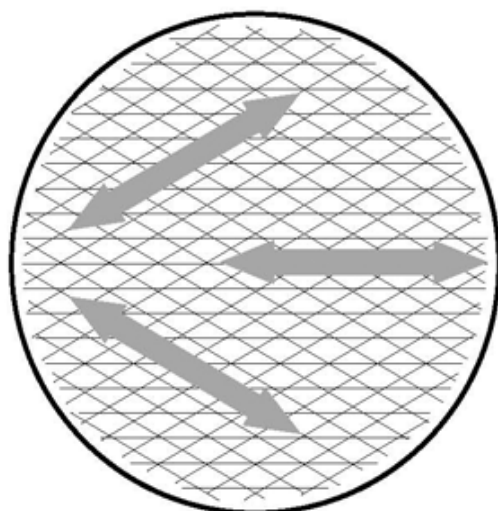


Figure 19 : Ensemencement par écouvillonnage

L'inoculum doit être bien réparti sur la surface de la gélose afin d'obtenir une bonne reproductibilité des diamètres de la zone d'inhibition. Avec les bactéries à Gram négatif, les inoculums trop lourds sont à éviter en prenant soin d'essorer l'excès de liquide sur l'écouvillon en le pressant légèrement à l'intérieur du tube avant l'ensemencement (**EUCAST 2010**).

Les disques témoins de ciprofloxacine à 5µg et de gentamycine à 120 µg sont disposés sur la même boîte de pétri.

La période d'incubation est de 16 à 20 heures à 37°C et il est recommandé de ne pas la raccourcir ou l'allonger (**EUCAST 2010**).

*Pour obtenir des résultats reproductibles, il faut respecter la règle des **trois fois 15minutes** établie par EUCAST 2010:*

- *L'inoculum préparé précédemment doit êtreensemencé en moins de 15 mn*
- *Lorsque les boîtes de pétri sontensemencées, il faut appliquer les disques dans un délai maximum de 15 mn*
- *Lorsque les disques sont déposés, l'incubation est réalisée dans un délai maximum de 15 mn.*

Pour la lecture, la bordure de la zone d'inhibition correspond à une inhibition complète de la culture observée à l'œil nu. Lire les géloses Mueller Hinton à l'envers sur un fond noir avec une lumière réfléchissante (**EUCAST 2010**).

La mesure du diamètre d'inhibition est la moyenne de trois mesures différentes de diamètre.

Toute la méthode peut être résumée dans la figure suivante :

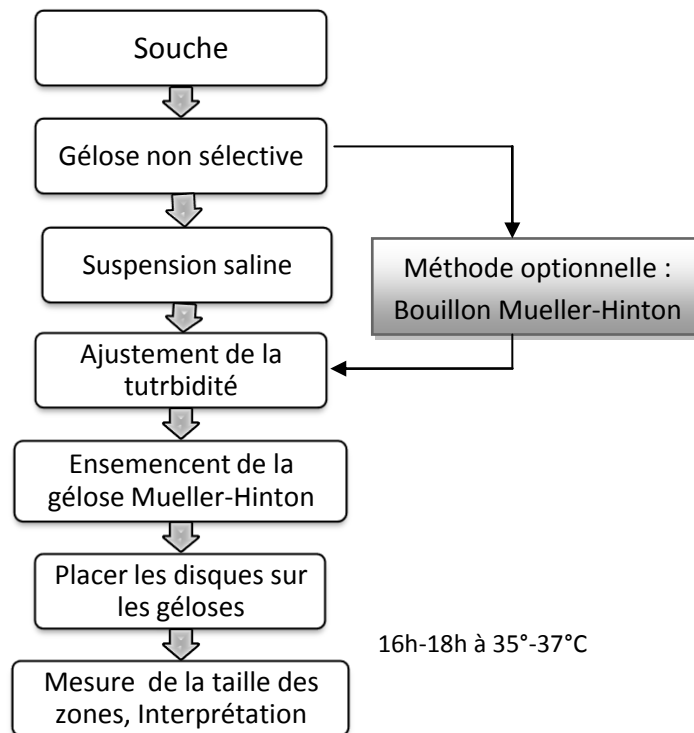


Figure 20 : Diffusion en gélose par la méthode des disques
(Jorgensen et al., 1999 ; NCCLS, 1999)

L'activité antibactérienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm (Parck et al., 2006 ; Nath et al., 2008 ; Rahmoun, 2009). Ce produit peut avoir :

Très forte activité : diamètre ≥ 30 mm ; forte activité diamètre 21-29 mm

Moyenne activité : diamètre 16-20 mm ; faible activité diamètre 11-15mm

Petite ou pas d'activité : diamètre ≤ 10 mm

➤ *Tests antibactériens de la fraction insaponifiable*

Des disques imprégnés de 5 µl de la fraction insaponifiable diluée dans du DMSO à moins de 2% (Cos et al., 2006). La concentration obtenue est de 1,15 mg/disque. Ces disques sont placés au centre des cinq boîtes, sur le milieu Mueller-Hinton déjàensemencé par les souches bactériennes déjà citées. Les conditions opératoires ont été respectées selon les recommandations d'EUCAST.

L'incubation se fait à une température de 37°C/20h. La lecture s'effectue en mesurant le diamètre d'inhibition.

➤ *Tests de synergies de pouvoirs antibactériens de l'huile de coloquinte avec l'huile de nigelle et l'huile d'olive*

Les trois huiles font l'objet de recherche dans notre équipe (sur le plan physiologique) et il a paru intéressant de faire des tests de synergie d'action entre l'huile de coloquinte avec l'huile de nigelle d'un côté et l'huile de coloquinte avec l'huile d'olive d'un autre côté. Même un essai a été fait sur la synergie d'action entre l'huile de nigelle et l'huile d'olive.

Cinq disques imprégnés de l'huile de coloquinte (sans émulsification) sont déposés l'un à côté de l'autre sur le milieu Mueller Hinton déjàensemencé avec une souche bactérienne par exemple *Escherichia coli*, et cinq autres disques avec une autre huile (olive ou nigelle) sont déposés de manière perpendiculaire sur les autres disques de l'huile de coloquinte comme le représente la figure suivante :

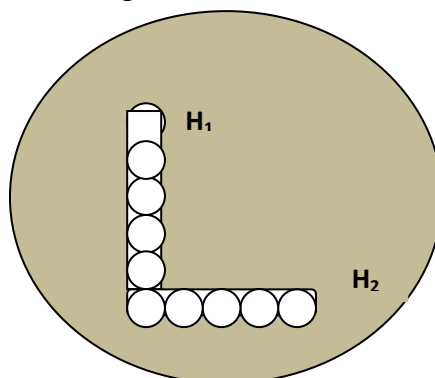


Figure n°21 : Test de synergie d'activité antibactérienne des deux huiles

Techniques de diffusion sur gélose (Denis et al., 2007)

H₁ : Huile de coloquinte

H₂ : Huile d'olive ou huile de nigelle

L'opération est répétée pour chaque souche bactérienne. Les 3 combinaisons entre les différentes huiles sont procédées de la manière suivante :

- Huile de coloquinte et huile de nigelle
- Huile de coloquinte et huile d'olive
- Huile de nigelle et huile d'olive.

Toutes les boites sont mises dans l'étuve à 37°C/20h et la lecture se mesure en prenant compte toutes les zones d'inhibitions set trouvant autour des disques.

III.1.3.4 Méthode des dilutions (contact direct)

Cette méthode consiste à disperser l'huile à des concentrations variables dans le milieu de culture gélosé avant sa solidification (**Benjilali et al. 1986, Abi-ayad, 2009**).

Le test de sensibilité des bactéries aux différentes concentrations de l'huile est réalisée par émulsification de l'huile dans le DMSO à différentes concentrations et sa dispersion dans la gélose Mueller Hinton encore liquide ; ce mélange est versé dans la boite de pétri et laissé se refroidir.

L'huile doit être mélangée avec un émulsifiant qui est le DMSO à moins de 2 % à cause de sa faible solubilité dans le milieu Mueller-Hinton (**Kesari et al., 2010**). 2ml de chaque dilution est mélangée à 18ml de milieu Mueller-Hinton solide.

En dernier, l'ensemencement se fait par spot de chaque souche de l'inoculum contenant 10⁴, et l'incubation se fait après 16 à 20 heures à 37°C (**Haddouchi et al., 2009**).

	0	1	2	3	4	5	6
DMSO (µl)	500	450	400	350	300	250	200
H.C (µl)	0	50	100	150	200	250	300
Concentration finale (µl/ml)	0	2.5	5	7,5	10	12,5	15

Tableau n°1 : Les différentes dilutions de l'huile de coloquinte avec le DMSO

III.2 Evaluation de l'activité antifongique

Les souches de champignons utilisées dans cette étude sont des souches disponibles au laboratoire de mycologie du laboratoire de « produits naturels, activité biologique et synthèse », elles sont isolées sur milieu Sabouraud et repiquées d'une manière régulière.

Les 3 souches utilisées sont les suivantes :

- *Alternaria alternaria* MNHN 843390

- *Aspergillus flavus* MNHN 994294

- *Cladosporium herbarum* MNHN 3369

La détermination du pouvoir antifongique est évaluée par la technique décrite par Chang et *al.* (2000). Un volume de 1 ml de mélange de l'huile diluée dans le DMSO (diméthyle sulfoxyde) à différentes concentrations est mélangé avec 19 ml du milieu PDA acidifié et sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles.

	0	1	2	3	4
DMSO (µl)	1000	500	200	100	0
L'huile (µl)	0	500	800	900	1000
Concentration finale (µl/ml)	0	25	40	45	50

Tableau n°2 : Les dilutions de l'huile de coloquinte dans le DMSO

Les disques de mycélium de chaque moisissure de 6 mm de diamètre prélevés du périphérique d'une culture de 5 à 7 jours sont inoculés au centre des boîtes puis incubés à 25±2 °C/5 jours (Hazideh et *al.*, 2009)

La lecture a été effectuée le quatrième jour et la mesure de l'indice antifongique ou le pourcentage d'inhibition se calcule de la manière suivante (Hazideh et *al.*, 2009) :

$$\text{Indice antifongique (Ia)} = \frac{db-da}{db} \times 100$$

Où :

da : diamètre de la zone de la croissance mycélienne de l'essai

db : diamètre de la zone de la croissance mycélienne du témoin

Chapitre III

Résultats et discussions

I. Extraction de l'huile

L'huile de *Citrullus colocynthis* a été extraite des graines par la méthode soxhlet en utilisant l'éther de pétrole comme solvant. D'autres solvants d'extraction sont décrits dans la littérature tels que l'hexane, l'éther de pétrole et le chloroforme (**Adrian et al., 1998**). Dans notre travail, nous avons préféré effectuer l'extraction avec l'éther de pétrole (bp : 35-60°C) car il est plus volatil que l'hexane (bp : 69°C) et le chloroforme (bp : 60,5-61,5°C); on minimise ainsi les traces de solvant dans l'huile de coloquinte. (bp : « boiling point »)

Au cours de l'extraction, deux paramètres ont été mis en jeu :

I.1 Mode de séchage des graines

Après le lavage des graines, le séchage a été fait de deux manières différentes :

- ❖ A l'air libre sur la paillasse de laboratoire pendant 48 à 72 heures
- ❖ A l'étuve à 50°C toute une nuit (**Armougom, 1998 ; Zohara et al., 1999**)

Les rendements, obtenus après 6 heures d'extraction, sont représentés dans le tableau suivant :

<i>Mode de séchage des graines</i>	<i>Graines séchées à l'air libre</i>	<i>Graines séchées à l'étuve</i>
<i>Rendement en huile(%)</i>	22.55	17,93

Tableau n°3 : Rendement en huile des graines séchées à l'air et à l'étuve

Le rendement en huile des graines séchées à l'étuve est inférieur à celui des graines séchées à l'air libre. La différence est assez significative, elle est de l'ordre de 5%. Il est

cependant souhaitable de sécher les graines à la plus basse température possible (température ambiante) ce qui permettrait d'éviter toute dégradation qualitative de l'huile.

Des travaux de la littérature, effectués sur d'autres types de graines, suggèrent de les sécher à des température de 80-100°C avant toute extraction, dans le but d'éliminer le maximum d'eau et augmenter ainsi les rendements par rapport à la matière sèche (**Haidara, 1996**). Il est à noter que cette méthode ne tient pas compte de l'altération éventuelle de l'huile obtenue.

I.2 Temps d'extraction

Le temps d'extraction joue un rôle important dans les rendements en huile, ainsi en modifiant les temps d'extractions de 4 à 8 heures, on obtient les résultats suivants :

<i>Temps d'extraction</i>	<i>4 heures</i>	<i>6 heures</i>	<i>8 heures (4h+4h)</i>
<i>Rendement en huile (%)</i>	20,14	22,55	22,67

Tableau n°4 : Rendement en huile selon le temps d'extraction

Les rendements d'extractions augmentent avec le temps, mais après avoir extrait toute l'huile pendant 8h de temps (temps préconisé par la méthode officielle), il n'y a plus d'accroissement sensible du rendement ; ce qui nous amène à la conclusion qu'une extraction de 6 heures est largement convenable d'un point de vue rapport temps/rendement. De plus, en minimisant le temps d'extraction, on évite toute altération possible de l'huile.

Les résultats d'extractions de l'huile de coloquinte décrit dans la littérature ne dépassent pas 17- 19% (**Zohara et al., 1999**).

I.3 Mode de conservation de l'huile de coloquinte

Après avoir séchée l'huile pendant une demi-heure dans l'étuve, celle-ci est stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des flacons en verre fumé au réfrigérateur.

Une analyse physico-chimique et une étude de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) est réalisée sur l'huile de coloquinte et est décrite dans les chapitres suivants.

II. Analyse physico-chimique de l'huile de Coloquinte :

Une analyse complète d'une huile végétale nécessite l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse de préférence couplée avec de la spectrométrie de masse. Cependant, avant que ces techniques aient été développées, on utilisait et on utilise encore des paramètres plus faciles d'accès pour caractériser les différentes caractéristiques physico-chimiques des huiles.

II.1. Densité

La densité relative d'une huile est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C.

La densité de l'huile est mesurée à une température de 20°C. Toutes les précautions ont été prises pour mesurer précisément la densité à cette température, qui est la température recommandée dans la méthode officielle (NF ISO 6883).

La densité trouvée pour l'huile de coloquinte est de **0,909**.

La mesure de la densité, à cette température (20°C), nous a permis de comparer nos résultats à ceux de la littérature.

L'huile de coloquinte possède une densité similaire à celle de l'huile d'olive (0,910) ; cependant, elle est inférieure aux densités d'autres huiles réunies dans le tableau n°5.

<i>Huiles végétales</i>	<i>Densité à 20°C</i>
Olive	0,910
Tournesol	0,920
Maïs	0,919
Argan	0,917
Coloquinte	0,909

Tableau n°5 : Densités de quelques huiles végétales

La valeur de la densité de l'huile de coloquinte ne nous donne pas d'information supplémentaire, si ce n'est qu'elle est dans le même ordre de grandeurs que les huiles végétales comestibles.

II.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction « R » des huiles varie en fonction de leurs insaturations. Il croît avec le degré d'insaturation des acides gras contenus dans les matières grasses.

En fonction de l'indice de réfraction, on peut classer les corps gras en deux groupes (**Adrian et al., 1998**):

- Les graisses lauriques végétales : dont l'indice de réfraction est compris entre

R = 1,448 et R = 1,458.

- Les huiles végétales dont l'indice de réfraction est compris entre

R = 1,468 et R = 1,490.

Dans notre cas, l'indice de réfraction mesurée de l'huile de coloquinte est de R = 1,474 .

Cette valeur est en accord avec d'autres auteurs qui donnent une valeur de l'indice de réfraction autour de R = 1,474 (**Abu nasr, 1953 ; Akpambang, 2008**)

Ollé (2002) a proposé une classification des huiles en fonction de leur composition en acide gras majoritaire (acide oléique, acide linoléique, acide linoléique) et leur indice de réfraction.

A titre comparatif, on donne les indices de réfractons de quelques huiles végétales (voir tableau n°6) :

<i>Différentes huiles</i>	<i>Indice de réfraction</i>	<i>Classification des huiles (Ollé)</i>
Olive	1,466-1,468	Huile riche en acide oléique 1,468<R<1,472
Tournesol	1,472	Huiles riches en acide linoléique 1,471<R<1,477
Argan	1,4711	
Coloquinte	1,474	
Nigelle	1,472	
Sésame	1,470	
Foie de morue	1,481	Huiles riches en acide linoléique 1,480<R<1,523

Tableau n°6 : Indices de réfraction de quelques huiles

La lecture de ce tableau nous permet de prévoir de façon approximative que l'huile de coloquinte contiendrait majoritairement l'acide linoléique.

II.3. Acidité et indice d'acide

Avant d'aborder cette partie, nous ferons la différence entre l'acidité et l'indice d'acide.

➤ L'**acidité** est le pourcentage d'*acides gras libres* (=FFA pour *Free Fatty Acids*) exprimé conventionnellement en acide laurique pour le coprah et le palmiste, acide palmitique pour le palme, acide oléique pour la majeure partie des corps gras.

L'acidité renseigne principalement sur l'altération des triglycérides à la suite d'une hydrolyse chimique ou enzymatique. Les acides gras libres non oxydés présentent un intérêt nutritionnel quasiment équivalent aux mêmes acides gras sous forme glycéridique (**Aubret et al., 2003**).

Dans notre étude de l'huile de coloquinte, nous avons exprimé l'acidité par rapport à l'acide oléique.

L'acidité oléique (FFA) de l'huile de coloquinte est de **1,83%**.

Par comparaison à l'acidité des huiles de coloquinte décrites par d'autres auteurs (acidité variant de 0,35% à 1,5%), notre huile de coloquinte a une acidité libre plus ou moins élevée (**Abu nasr, 1953 ; Obeid, 1996 ; Ziyada et al. ; 2008 ; Giwa et al.,2010**).

L'acidité de l'huile de coloquinte est élevée même par rapport à d'autres huiles végétales, mais elle reste en deçà des normes du Codex Alimentarius (3,3%), ce qui ne la rend pas impropre à la consommation.

<i>Différentes huiles végétales</i>	<i>FFA(%)</i>
Olive	0,5-1,5
Tournesol	0,2
Argan	0,49-1,3
Coloquinte	1,83
Sésame	2,37

Tableau n°7: Taux d'acidité oléique dans différentes huiles végétales

Un faible taux d'acidité contribue à donner à l'huile une plus grande stabilité face à l'oxydation par l'air. C'est d'autant plus important si l'huile a une haute teneur en acides gras insaturés.

Il est recommandé pour une huile comestible d'avoir un taux d'acidité faible (inférieur à 3,3% norme imposée par Codex Alimentarius) pour supporter une longue conservation sans détérioration (**Onyeike et al., 2002**).

➤ **L'indice d'acide** est la masse de potasse (en %) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres du corps gras. Il indique le degré d'altération des esters (essentiellement des triglycérides) présents dans le corps gras.

L'indice d'acide de l'huile de coloquinte est de **3,64%**.

A titre indicatif, nous donnons les indices d'acides de quelques huiles végétales, pour comparer l'indice d'acide de l'huile de coloquinte :

<i>Différentes huiles végétales</i>	<i>Indice d'acide (%)</i>
Olive	1-3
Tournesol	0,4
Argan	0,98-2,6
Coloquinte	3,64
Sésame	4,74

Tableau n°8 : Indices d'acide de quelques huiles végétales

Un indice d'acide faible est indicatif d'une huile de bonne qualité.

II.4. Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde est le nombre de microgrammes d'oxygène actif contenus dans un gramme de corps gras et susceptibles d'oxyder l'iodure de potassium. Il est exprimé en microgrammes par gramme ou plus souvent en milliéquivalent d'oxygène actif par kilogramme.

L'indice de peroxyde représente l'état d'oxydation au moment du dosage.

L'indice de peroxyde de l'huile de coloquinte est de **1,17 meqO₂/kg**.

Il a été démontré que les huiles fraîches ont un indice de peroxyde inférieur à 10 meqO₂/kg et elles deviennent rances quand l'indice de peroxyde se trouve dans la plage de 20 à 40 meqO₂/kg (**Onyeike et al., 2002**).

Pour comparaison, l'huile de coloquinte du Nigeria est de 1,72 meqO₂/kg (**Akpambang, 2008**).

L'indice de peroxyde trouvé dans notre cas est assez bas, ce qui nous permet de conclure que l'huile étudiée n'a pas encore subi d'altération.

II.5. Indice de saponification

L'indice de saponification rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras. C'est la quantité de potasse, exprimée en milligrammes, nécessaire pour saponifier 1 g de corps gras.

L'indice de saponification de l'huile de coloquinte est de **219**.

L'indice de saponification des huiles de coloquinte étudiée au Soudan et en Malaisie sont de 206 et de 204,44 respectivement c'est-à-dire dans le même ordre de grandeur que l'indice trouvé pour notre huile (**Obeid, 1996 ; Ziyada, 2008 ; Giwa et al.,2010**).

Les indices de saponifications de différentes huiles végétales sont résumés dans le tableau suivant :

<i>Différentes huiles végétales</i>	<i>Indice de saponification</i>
Olive	185-200
Tournesol	188-194
Argan	189-193
Coloquinte	219

Tableau n°9: Indices de saponification de différentes huiles végétales

Par rapport aux autres huiles végétales, l'indice de saponification de l'huile de coloquinte semble être plus élevé, ce qui pourrait indiquer la présence d'acide gras à chaîne carbonée pas trop longues.

II.6. Indice d'ester

L'**indice d'ester** d'un lipide est la masse de potasse (KOH) (exprimée en mg) nécessaire pour saponifier les acides gras estérifiés contenus dans 1 g de matière grasse.

Il est égal à l'indice de saponification pour les glycérides purs et il permet de déterminer la masse molaire des glycérides.

Cet indice n'est pas mesuré, il est calculé :

Indice d'ester = indice de saponification - indice d'acide.

L'indice d'ester de l'huile de coloquinte est de 215,76 .
--

II.7. Indice d'iode

L'indice d'iode mesure globalement le degré d'insaturation d'un corps gras en déterminant le nombre de grammes d'iode fixé par 100 g de corps gras. En présence d'un large excès d'halogénure d'iode, l'iode est fixé sur les doubles liaisons en une heure. L'iode non consommé est ensuite dosé en retour par le thiosulfate.

Plusieurs méthodes sont proposées :

- méthode de Wijs en présence de trichlorure d'iode ;
- méthode de Hanus en présence de monobromure d'iode ;
- méthode au brome.

La méthode de Wijs est certainement la plus couramment utilisée et c'est la méthode que nous avons mise en œuvre pour déterminer l'indice d'iode de l'huile de coloquinte.

L'indice d'iode de l'huile de coloquinte est de 86 .

La valeur révélée, après analyse par la méthode de Wijs, est de 86, elle est inférieure à l'indice d'iode des huiles de coloquinte rapportés par la littérature qui sont de 122 à 129 (**Abu nasr, 1953 ; Obeid, 1996 ; Ziyada et al. 2008**).

Notre indice paraît faible, mais reste dans la plage des indices d'iode des huiles végétales comme l'huile d'olive et l'huile d'arachide (voir tableau n°10) :

<i>Différentes huiles végétales</i>	<i>Indice d'iode</i>
Olive	75-94
Tournesol	120-134
Argan	99-102
Coloquinte	86
Arachide	85-108
Soja	125-138

Tableau n°10 : Valeurs des indices d'iode de différentes huiles végétales

Il est raisonnable de prédire qu'une huile possédant un indice d'iode autour de 85 serait moyennement riche en acides gras insaturés ce qui reste à confirmer par CPG/SM.

II.8. Teneur en insaponifiable

L'insaponifiable est constitué par l'ensemble des composés extractibles par les solvants organiques (hexane, éther éthylique) directement après traitement du corps gras par la potasse alcoolique.

Il représente la partie non glycéridique de l'huile et qui est très riche en métabolites secondaires (du cholestérol, des phytostérols, de l'ergostérol, des pigments, des vitamines liposolubles, des hydrocarbures, ...etc.).

La teneur en insaponifiable de la majorité des huiles végétales est généralement faible, elle varie entre 0,3% et 1,5%. Certains cas particuliers de lipides d'origine végétale (huile de germe de blé) ou animale (huile de foie de morue) renferment des teneurs en insaponifiable nettement plus élevées jusqu'à 20%.

La teneur en insaponifiable de l'huile de coloquinte est de **2,28%**.

Certains chercheurs (Abu nasr et Obeid) ont trouvé que l'huile de coloquinte ne renfermait que 1,01% à 1,72% d'insaponifiable. Notre huile dépasse largement ces valeurs, ce qui pourrait lui donner une spécificité particulière.

<i>Différentes huiles végétales</i>	<i>Teneur en insaponifiable</i>
Olive	1,5%
Tournesol	0,4%-1,4%
Sésame	0,5%-2,3%
Coloquinte	2,28%
Argan	0,8%-1,1%

Tableau n°11 : Teneur des huiles végétales en insaponifiable

L'huile de coloquinte traitée dans notre travail pourrait avoir un intérêt majeur, qui serait due aux taux d'insaponifiable (comparé aux autres huiles végétales) et à sa nature.

II.9. Récapitulatif des résultats

Les différentes valeurs des caractéristiques physico-chimiques se divisent en 2 groupes :

- ceux qui rendent compte de la qualité de l'huile (densité, indice de réfraction, indice de saponification, indice d'iode et teneur en insaponifiable).
- ceux qui rendent compte de l'altération de l'huile (indice d'acidité, acidité FFA et indice de peroxyde).

Le récapitulatif de tous les résultats de l'analyse physico-chimique de l'huile sont représentés dans le tableau suivant n° **12**:

<i>Caractéristiques physico-chimiques</i>	<i>Résultats d'analyses</i>	<i>Indices de qualité ou d'altération</i>	<i>Normes selon Codex</i>
Densité relative à 20°C	0,9087	Caractéristiques de qualité	-
Indice de réfraction à 20°C	1,474		-
Indice de saponification (mg KOH/g)	219		-
Indice d'iode (Wijs)	86		-
Teneur en insaponifiable (%)	2,28		-
Indice d'acide (%)	3,64	Caractéristiques d'altération	6,6%
Acidité (FFA en %)	1,83		3,3%
Indice de peroxyde (meq/Kg)	1,17		10meq/kg*

* : c'est une valeur imposée pour les huiles végétales sauf pour l'huile d'olive dont la norme est de 20meq/kg.

Tableau n°12 : Récapitulatif des résultats d'analyses physico-chimiques de l'huile de coloquinte

Dans notre cas, nous avons comparé les valeurs des caractéristiques physico-chimiques qui rendent compte de l'altération aux normes imposées par le Codex Alimentarius.

A la vue de ces résultats, notre huile de coloquinte pourrait être classée parmi les huiles comestibles, même si ce travail devrait être complété par une étude toxicologique.

III. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de coloquinte :

La maîtrise des infections bactériennes et fongiques devient complexe du fait de l'émergence de bactéries et de champignons résistants à de nombreux antibiotiques conventionnels.

Face aux problèmes de santé publique, les plantes médicinales pourraient apporter une réponse thérapeutique adaptée à ces phénomènes. Les remèdes à base de plantes constituent une nouvelle alternative pour combattre ces épidémies qui, à notre ère ne devaient plus exister.

III.1 Activité antibactérienne de l'huile de coloquinte :

III.1.1 Méthode de diffusion des disques (contact indirect)

Ce travail avait pour but de démontrer si l'huile de coloquinte a un pouvoir antibactérien sur les souches bactériennes pathogènes. Pour cela, nous avons choisi deux méthodes pour évaluer l'activité biologique de l'huile.

La première étape consistait à mesurer la sensibilité des bactéries à l'huile pure sans émulsifiant ; dans ce cas on a utilisé la méthode de diffusion sur gélose. Des disques imprégnés de l'huile avec 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l et 10 μ l sur la gélose Mueller-Hinton ensemencée. Après incubation, on mesure les zones d'inhibitions qui sont sous forme d'un halo clair autour des disques.

Aucune zone d'inhibition n'a été détectée pour les différentes concentrations. La mesure des disques ne fournit que des informations qualitatives sur la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis du produit à tester (**Hart, 1999 ; Rey, 2010**).

Comme notre équipe a travaillé sur l'huile de nigelle et l'huile d'olive, on a fait quelques tests avec cette méthode en essayant d'avoir une idée sur l'activité de chaque huile sur les différentes souches bactériennes.

D'abord, on a commencé par mettre deux disques de chaque huile imprégnés de 5 µl et 10 µl sur la géloseensemencée, le tout dans la même boîte. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

	L'huile de coloquinte		L'huile d'olive		L'huile de nigelle (Ø en mm)	
<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	6	10	18
<i>Enteroccus faecalis</i>	6	6	6	6	11	25
<i>Bacillus cereus</i>	6	6	6	6	18	29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	6	6	6	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	6	6	6	25	40

Tableau n°13 : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions des différentes huiles (l'huile de coloquinte, l'huile d'olive et l'huile de nigelle)

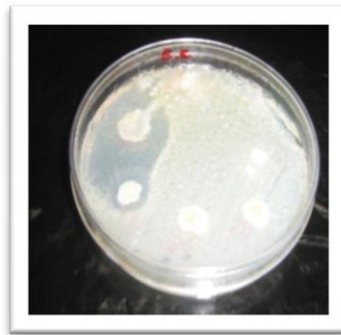


Photo 3 : Zones d'inhibitions de l'huile de nigelle de la souche *Bacillus cereus* et sa résistance aux autres huiles (olive et coloquinte)



Photo 4 : Zones d'inhibitions de l'huile de nigelle de la souche *Staphylococcus aureus* et sa résistance aux autres huiles (olive et coloquinte)

En cherchant l'activité biologique de l'huile de coloquinte, les résultats positifs ont été trouvés ailleurs chez l'huile de nigelle sauf pour le *Pseudomonas aeruginosa* qui reste résistant pour les trois huiles.

Les tests de synergie n'ont donné aucun résultat positif puisque la coloquinte n'a pas d'effet antibactérien.

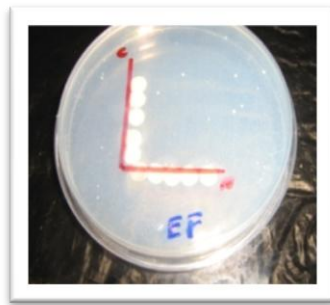


Photo 5 : Test de synergie entre l'huile de coloquinte et l'huile de nigelle sur *Enterococcus faecalis*

Ce test a confirmé la résistance des 5 souches à l'huile de coloquinte et à l'huile d'olive et a révélé que les 4 souches bactériennes ont été sensibles à l'huile de nigelle (sauf les *pseudomonas*).

Le test synergique entre l'huile d'olive et l'huile de coloquinte n'a donné aucun résultat positif.

Même un test antibactérien a été réalisé sur l'activité antibactérienne de l'insaponifiable (la fraction non lipidique de l'huile) dilué dans le DMSO à raison de 1,15mg/disque, et le disque a été déposé au centre de la boîte de chaque souche. Aucune activité n'a été décelée sauf pour *Escherichia coli* dont la zone d'inhibition était de 8 mm ; on peut déduire que l'insaponifiable n'a pas eu d'activité.

III.1.2 Méthode des dilutions (contact direct)

Cette méthode a été utilisée pour la confirmation des premiers résultats et d'essayer de chercher s'il y a activité à une certaine concentration.

Après avoir dilué l'huile de coloquinte dans le DMSO à différentes concentrations et l'avoir mélangé avec le milieu de culture, l'ensemencement a été effectué par spot dans la même boîte de pétri (**Haddouchi et al, 2009**).

Après incubation à 37°C pendant 20 H, une lecture a été effectuée et aucune souche n'a été sensible à notre huile de coloquinte.

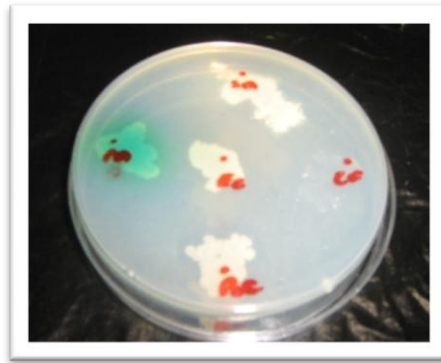


Photo 6 : Ensemencement par spot

Toutes les souches bactériennes ont été résistantes à différentes concentrations de l'huile de coloquinte, ce qui permet de dire que l'huile de coloquinte n'a eu aucun pouvoir inhibiteur sur *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Certains chercheurs ont travaillé sur les extraits de toutes les parties de la plante *Citrullus colocynthis* tels les racines, la tige, les feuilles, les fruits et les graines. Ils ont démontré que toutes les parties possèdent une activité antibactérienne contre les Gram(+) (*Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*) et les Gram(-) (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) à un degré moindre pour les racines. Les fruits et les graines qui n'ont pas atteint leur maturité ont été les plus actifs contre les bactéries déjà citées ; ils sont même arrivés à démontrer que les métabolites secondaires diffèrent d'une région à l'autre en quantité et en qualité (exemple les alcaloïdes et les flavonoïdes) et par conséquent l'activité antibactérienne de chaque partie de la plante (**Marzouk et al., 2009 ; Marzouk et al., 2010,**).

III.2. Activité antifongique de l'huile de coloquinte :

Les maladies infectieuses dues aux champignons sont en général limitées à la peau et aux muqueuses : mycoses locales. Rarement en cas de déficit immunitaires, on observe une atteinte des organes internes : mycoses systémiques. Les agents les plus courants des mycoses sont les *dermatophytes* qui après une contamination de la surface externe résident dans les cheveux ou les ongles.

L'activité de l'huile de coloquinte a été effectuée sur des souches qui étaient disponibles au niveau de notre laboratoire et qui sont :

-*Altenaria alternaria*

-*Aspergillus flavus*

-*Cladosporium herbarum*

Les résultats obtenus après incubation de 5 jours à 25°C sont représentés dans le tableau suivant :

	0	1	2	3	4	Ø de la souche témoin (mm)
Le pourcentage en DMSO	5%	2,5%	1%	0,5%	0%	
<i>Altenaria alternaria</i> (Ø mm)	14	17	19	37	55	60
la en %	76,66	71,66	68,33	38,33	8,33	
<i>Aspergillus flavus</i> (Ø mm)	6	8	8	9	16	19
la en %	68,42	57,9	57,9	52,63	15,78	
<i>Cladosporium herbarum</i> (Ø mm)	8	8	12	15	80	90
la en %	91,11	91,11	86,66	83,33	11,11	

la : indice antifongique

Tableau n°14 : Présentation des résultats de l'activité antifongique de l'huile de coloquinte

L'huile de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) a montré une activité antifongique accentuée quand elle a été mélangée avec le DMSO (quand sa concentration était inférieure à 2%) (Cos et al., 2006). A 0,5% de DMSO, l'huile de coloquinte a eu une forte activité vis-à-vis de la croissance du *Cladosporium herbarum* avec un indice de 83,33% à une concentration de 45µl/ml.

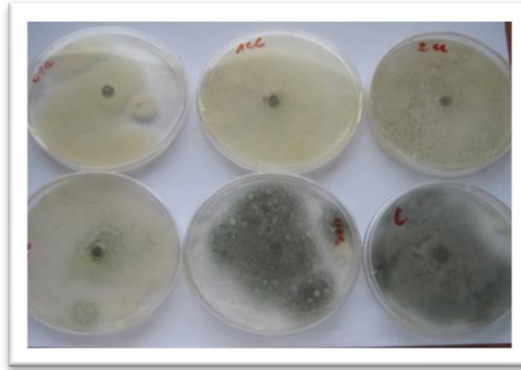


Photo 7 : Effet de l'huile de coloquinte sur *Cladosporium herbarum*

Sans émulsifiant, c'est la souche *Aspergillus flavus* qui a été la plus sensible de 16% à 50 µl/ml.

Pour la souche *Aspergillus flavus*, nous avons essayé de comparer nos travaux avec ceux de notre collègue M^r Amrouche Chargé de cours et son équipe (2010) à l'université de Béchar et il a testé l'activité antifongique de l'huile de coloquinte à différentes concentrations sur la souche citée ci-dessus sans utiliser d'émulsifiant. Les résultats ont révélé que l'indice antifongique de l'huile de coloquinte est 26,5% sur *Aspergillus flavus* à une concentration de 300 µl/ml. Les différences dans les résultats pourraient être due :

-la coloquinte étudiée a été collectée dans la région de Béchar alors que la notre, elle est de Mécheria.

-Le solvant d'extraction utilisé est le chloroforme alors que notre extraction a été réalisée par l'éther de pétrole.

Plusieurs chercheurs révèlent que l'activité antifongique est due aux acides gras majoritaires de l'huile tels l'acide linoléique, oléique et linoléique (**Kesari et al., 2010**).

Marzouk et al. (2009) ont démontré que les extraits de fruits et de graines immatures présentaient une bonne activité antifongique surtout vis-à-vis de différentes espèces de *Candida*.

Ce qu'on pourrait conclure dans cette partie que l'activité antibactérienne et antifongique ne réside pas dans l'huile mais dans les autres composants de la graine et en particulier les métabolites secondaires.

Conclusion Générale

Le sujet abordé dans ce mémoire s'inscrit dans une étude globale sur l'huile de coloquinte et son impact physiologique sur les rats diabétiques et obèses. Il était indispensable pour poursuivre ce travail d'effectuer une analyse physico-chimique et microbiologique de cette huile.

Nous avons réussi à optimiser le rendement en huile de coloquinte en fixant le temps d'extraction à 6 heures et en utilisant l'éther de pétrole comme solvant d'extraction.

L'analyse physico-chimique de l'huile de coloquinte a révélé grâce à l'indice de réfraction et à l'indice d'iode que l'huile est riche en acide gras insaturés. Les valeurs des indices d'acide et de peroxyde révèlent que cette huile peut être conservée convenablement au cours du temps en respectant bien sûr les conditions de stockage. Les valeurs des caractéristiques physico-chimiques de l'huile de coloquinte sont intermédiaires par rapport à celles d'autres huiles végétales décrites.

Par ailleurs la teneur en insaponifiable de l'huile de coloquinte est de 2,28%, elle est supérieure à celles d'autres huiles végétales, ce qui pourrait lui donner une valeur particulière.

Dans une deuxième partie, notre travail a été consacré à l'étude du pouvoir antimicrobien de l'huile de coloquinte. Peu de travaux sont rapportés sur les activités antibactériennes et antifongiques des huiles fixes.

L'huile n'a pas eu d'activité sur les souches bactériennes à notre disposition, cependant il pourrait en être autrement sur d'autres espèces bactériennes.

Par rapport à l'activité antifongique, l'huile de coloquinte, émulsifiée dans du DMSO (à moins de 2%), s'est révélée être active sur *Cladosporium herbarum* et moins active sur *Aspergillus flavus* et *Alternaria alternaria*. Alors que l'huile pure n'a pas donné de bons résultats sur les souches citées précédemment (activité ne dépassant pas 22%).

Nous nous sommes fixés comme perspectives à ce travail:

- ➡ D'analyser l'huile de coloquinte par CPG/SM, puis d'affiner l'analyse sur l'insaponifiable car il pourrait renfermer de nombreuses molécules «intéressantes».
- ➡ De tester l'huile de coloquinte sur d'autres souches de bactéries et de champignons, mais aussi tenter de l'émulsifier avec d'autres produits.
- ➡ D'effectuer une étude toxicologique de l'huile de coloquinte pour pouvoir la valoriser comme huile végétale comestible ou thérapeutique.
- ➡ De mener des études microbiologiques sur d'autres huiles fixes telles que l'huile de nigelle. Cette dernière semble donner de meilleurs résultats quant à son pouvoir antibactérien.

Références Bibliographiques

A

Abdul Rahuman A. and Venkatesan P., 2008. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. *Parasitology Research* ; 130 : 133-139.

Abi-ayad M., . 2009. Contribution à l'étude physico-chimique de l'huile essentielle du Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) de la région de Tlemcen & de son activité antimicrobienne. Mémoire de magister ; Université Abou-Bakr Belkaïd, Tlemcen. p 50-55.

Aboun A., Aoun L., Bendimerad K., Boukerrou A., Kechich S., 2001. AntibioGramme en médecine vétérinaire. *Standardisation de l'aromatogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. Algérie édition.*

Abu nasr A . M., Potts W. M., 1953. the analysis and the characterization of the oil from the seed of *Citrullus colocynthis*. *The journal of the American Oil Chemist's Societ.y* ;118-120.

Amrouche A., Chaoufi A., Mebarki K., Sanebi A., 2010. Evaluation de l'activité antifongique de quelques huiles (huile de coloquinte-huile de nigelle-huile de lin) sur une souche d'*Aspergillus flavus* productrice d'aflatoxines. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en contrôle de qualité et analyses, Université de Béchar.

Anonymous, 1970. Hamdard Pharmacopoeia of Eastern Medicine. Handard National Foundation, Pakistan 2nd Impression p 373.

Adrian J., Potus J., Poiffait A., Dauvillier P., 1998. Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. *Techniques & documentation- Lavoisier* : P 47-53.

Akhar J., 1994. Studies on composition and metabolism of lipids in seeds of *Citrullus* species ; *thèse de Doctorat, Pakistan* : p 7.

Akhtar J.M., Amraan W. and Nusrullah A., 1999. Studies of lipase and phospholipase from the meal of *Citrullus colocynthis* of the family cucurbitaceae. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences* ; 36 :47-52.

Akpambang V. O. E, Amoo I. A., Izuagie A.A., 2008. Comparative compositional analysis on two varieties of melon (*Colocynthis citrullus*) and a variety of almond (*Prunus amygdalus*). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* ; 4(6) :639-642.

Armougom P. R., 1998. Etude de la fraction lipidique des graines de cucurbitacées tropicales des genres *Lagenaria*, *Luffa*, *Momordica*. *Thèse de doctorat, la Réunion, France* : P 74-78.

Aubret J-M., Mireille H., 2003. Qualité des huiles et acides gras de palme et des mélanges d'huiles acides, caractérisations chimique et biochimique. *Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole ; Travail conduit dans le cadre du GIE EURO NUTRITION* (France).

B

Baba Aissa F., 2000. Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. *EDAS* : 77-78.

badifu G. I. O., 1991. Unsaponifiable matter in oils from some species of cucurbitaceae. *Journal of food and analysis* 4 ;360-365.

Balandrin M. F., Kinghorn A.D., Farnsworth N.R., 1993. Human medicinals from plants. *American chemical society* : 2.

Bauer R., Wagner H., 1983. Curcubitacin-containing drugs, Analysis and Standardization of medicinal drugs and plant preparations by high-performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic methods; *Dtsch Apoth Ztg*, 123: 1313-1321.

Bauman L.F., Conway T.F. and Watson S.A., 1963. Heritability of variations in oil content of individual corn kernels. *Science*;139: 489-499.

Blaise P., 1997. Etude de lipides par spectroscopie de RMN, thèse de Doctorat I.N.P. de Toulouse.

Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. *Techniques & documentation- Lavoisier* ; ISBN : 2-85206-911-3 ; p606.

Burkill H.M., 1985. The useful plants of West Tropical Africa. Vol.1. Families A-D 2nd ed. Royal Bot. Gardens, kew, 960 pp.

C

Casimir Akoh C., Nwosu C. V., 1992. Fatty acids of melon seed oil lipids and phospholipids. *JAOCS*, Vol. 69, n°. 4 : 314-316.

Chabane Sari D., Sebbagh N., Taleb Bendiab S.A., Ouali F., Magnan C., Ktorza A., 2007. Effet de l'huile de coloquinte « *Citrullus colocynthis* » sur le métabolisme glucidique et lipidique chez le rat *Wistar* rendu diabétique par la streptozotocine. *Diabetes&metabolism* ;33 :151.

Cheftel J. C., Cheftel H., 1984. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. *Techniques & documentation- Lavoisier* : Vol 1 : 244-249.

Chen JC., Chiu MH., Nie RL., Cordell G.A., Qiu SX., 2005. Cucurbitacines and cucurbitane glycosides : structures and biological activities. *Natural Product Report* ; 22(3) :386-99.

Codex Alimentarius, 1999. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. 2^e Ed. *Commission du codex alimentarius*. codex@fao.org

Cos P., Arnold J Vlietinck, Dirk Vanden Berghe and Louis Maes, 2006. Anti-infective potential of natural products : How to develop a stronger in vitro' Proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* ; 106 :290-302.

Courtois J.E. et Perles R.,1981. Précis de chimie biologique 2. *Masson*, p 135.

D

Dastur J.F., 1962. Medicinal plants of India and Pakistan. D.B. Taraporevala Sons and Co. Pvt. Ltd. Bombay, India, p.56.

Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R., 2007. Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. *Elsevier Masson SAS* ; ISBN 978-2-294-01172-6 : p 552.

Dero A. C., 1998. Cahiers N°5, Aspects de l'islam. *ULB, Ipho* :6.

Duke J.A., Duke P. A. K. et Cellier J.L., 2008. Duke's Handbook of Medicinal Plants of the Bible. *CRC Press* : 115.

E

El-Magoli S.B., M.M. Morad, et A.A. El-Fara. 1979. Evaluation of some Egyptian melon seed oils. *Fette Seifen Anstrichmittel* 81(5): 201.

Esquinas-Alcazar J.T et Gulick P.J., 1983. Genetic resources of cucurbitaceae: a global report. Int. board for Plant Genet. Ressources , Rome; p101.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST, 2010. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. www.eucast.org

Eude A., 2005. Dosage des omegas 3 et 6 dans les supplements alimentaires et les poisons gras. *Laboratoire de chimie analytique*; projet d'étude. www.insa-rouen.fr

F

Feinbrun-Dothan N., 1978. Flora Palestina-Part III. *The Israeli Academy of Sciences and Humanities*. Jerusalem.

Fursa T.B., Filov I., 1982. XXI Cucurbitaceae (Citrullus, Cucurbita). In *Flora of Cultivated plants*. Eds. O. N. Korovina and T. B. Fursa; Moscow; Vol 21: 279.

G

Galal T.M., Saleh H., Snarkawy E., Jack M.S., Rosazz PN., 1997. "C-p-Hydroxy benzoyl glycoflavones from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry*; 44: 187-190.

Giwa S., Abdullah L.C., Adam N. M., 2010. Investigating « Egusi » (*Citrullus colocynthis* L.) Seed Oil as Potential Biodiesel Feedstock. *Energies* ;3 ; doi :10.3390/en3040607 : 607-618.

Grompone M.A., 1988. *Fat Sci. Technol.* 90. Jahrang, 12, 487.

Gulcan AV., Esra K., Abdullah E, Erdem Y., Ismail K., 2006. Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine, *Journal of Ethnopharmacology*; 107:418-423.

Guillemin S., 2006. Extraction aqueuse d'huile de colza assistée par hydrolyse enzymatique : optimisation de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de procédés de déstabilisation. *Thèse de doctorat, Lorraine, France* : 75-77.

Gurudeeban S., Satyavani K. and Ramanathan T., 2010. Bitter apple (*Citrullus colocynthis*) : An Overview of Chemical Composition and Biomedical Potentials. *Asian Journal of Plant Sciences* 9 (7) : 394-401. ISSN 1682-3974.

H

Hachicha S.F., Barrek S., Skandji T., Ghrabi Z. G. , Zarrouk H, 2007. Composition Chimique de l'huile des graines d'*Onopordon nervosum* subsp. *platylepis* Murb (Astéracées). *Journal de la Société Chimique de Tunisie* ;9 : 23-28.

Haddouchi F., Lazouni H.A., Meiane A., Benmansour A., 2009. Etude physico-chimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss&Reut. *Afrique science* 05/(2) : 246-259.

Haidara A. O., 1996. Valorisation d'une huile de végétale tropicale : L'Huile de Pourghère. *Mémoire, Sherbrooke, Canada*. P 47-61.

Hanelt P., 2001. Mansfel's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops. *Institute of plant genetics and crop plant research; Ed Springer; Vol 3* : p 1533-1535.

Harborne B. and Baxter H., 1993. *Phytochemistry dictionary, a hand book of bioactive compounds from plants.*Taylor and Francis Ltd, London.

Hart T. and Shears P, 1999. Atlas de poche de Microbiologie. *Medecine-sciences Flammarion*. 212-218.

Hazideh I., Peivastegan B., Kolahi M., 2009. Antifungal Activity of Nettle (*Urtica dioica* L.), Colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Shrad), Oleander (*Nerium oleander* L.) and Konar (*Ziziphus spina-christi* L.) Extracts on Plants Pathogenic Fungi.;*Pakistan Journal of Biological Sciences*12(1) :58-63.

Huang K., C.C. Akoh, et M. C. Erickson., 1994. Enzymatic modification of melon seed oil: Incorporation of eicosapentaenoic acid. *J. Agr. Food Chem*; 42:2646-2648.

Kirtikar K.R., Basu B.D., An I.C.S., 1957. Indian Medicinal Plants; 2nd Ed., L.M. Basu, Allahabad; 2; 1147.

L

Lecerf J. M., 2010. Huiles végétales. *Phytothérapie* ; 8 Doi 10.1007: 75-76.

Lecoq R., 1965. Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. *Edition Doin* ; Vol II.

M

Maiza K., Brac de la Perrière R. A., Hammiche V., 1993. Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. *Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique* : 169-171.

Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Edziri H., Haloui E., Fenina N., and Aouni M., 2009. Antibacterial and anticancer screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. From Medenine. *Journal of Ethnopharmacology*, 125 : 344-349.

Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Mhadhebi L., Fenina N., and Aouni M., 2010. Antibacterial and antifungal activities of several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. Immature fruits and seeds. *Journal de Mycologie Médicale*, 20 : 179-184.

Meena M.C. and Patni V., 2008. Isolation and identification of flavonoid quercetin from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Asian Journal of Experimental Science*, 22 : 137-142.

Memon U., Brohi A. H., Waseemuddin S. A., Azhar I., Bano H., 2003. Antibacterial screening of *Citrullus colocynthis*. *Pakistan Journal of the Pharmaceutical sciences*;16: 1-6.

Merad-Chiali M., 1973. Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle algérienne. *Thèse de doctorat, Alger, Algérie*. 149-151.

Munger H.M. and Robinson R.W., 1991. Nomenclature of *Cucumis melo* L. *Cucurbit Genetics Cooperative* 14: 43-44.

N

National Committee of Clinical Laboratory Standards NCCLS, 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: ninth informational supplement; Wayne; Pennsylvania: M100-S9, Vol 19. http://www.cdc.gov/idsr/files/french_lab_manual_idsr/chpt9.htm

Nath M., Sulaxna, Song X., Eng G., Kumar A., 2008. Synthesis and spectral studies of organotin (IV) 4-amino-3-alkyl-1,2,4-triazole-5-tionates: *In vitro* anti microbial activity. *Spectrochimica Acta Part ; A*; 70; 766-774.

O

Obeid M., 1996. Physico-chemical properties and industrial uses of Citrullus colocynthis seed oil. M. Sc. Thesis, National Oil Seed Processing Research Institute, University of Gezira, Sudan.

Odunfa S.A., 1981. Microbiology and amino acid composition of 'Ogiri', a food condiment from melon seeds. *Die Nahrung*, 25: 811-816.

Okigbo B.N., 1984. Neglected plants and horticultural and nutritional importance in traditional farming systems in tropical Africa; *Act. Hort.*, 53: 131-150.

Ollé M., 2002. Analyse des corps gras. *Bases documentaires: techniques d'analyses; Référence P3325; Ed. Techniques de l'ingénieur.* <http://www.techniques-ingenieur.fr>

Onyeike E. N., Acheru G. N., 2002; Chemical composition of selected Nigerian oil seeds and physicochemical properties of the oil extracts. *Food Chemistry*; 77: 431-437.

Owen R.W., Mier W, Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhader B., and Bartsch H., 2000. Phenolic compounds and squalene in olive oils : the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoides, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology ; 38* : 674-59.

P

Pagès-Xatart-Parès X., 2008. Technologie des corps gras (huiles et graisses végétales). *Ed. Techniques de l'ingénieur, p 1-17.*

Panda H., 2000. Herb Cultivation and Medicinal Uses. *National Institute of Industrial Re ; ISBN 8186623469, 9788186623466 : p 240-243.*

Park Byeoung-Soo, Lee Hung-Kyung, Lee Sung-Eun, Piao Xiang-Lan, Takeoka Gary R., Wong Rosalind Y., Ahn Young-Joon and Kim Jeong-Han., 2006. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, 105 : 255-262.

Pons A., 2004. Utilisation des dérivés heptafluorobutyrate pour l'analyse qualitative et quantitative des constituants des glycoconjugués par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Thèse. Université de Lille, France. P 60-68.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq Colberg C-M., Dusart J., 2003. Microbiologie. 5^e ed. De Boeck&Larcier s.a. : p 809.

R

Rahmoun M. N., 2009. Essai de tests biologiques (antibactériens/ antifongiques) de produits dérivés de la lawsone. *Mémoire de magister*, Université Abou-bakr Belkaïd, Tlemcen. p 36-40.

Ramadan M. F., Moersel J. T., 2006. Screening of the antiradical action of vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*; 19: 838–842.

Ramanathan T., Gurudeeban S., and Satyavani K., 2011. Local anesthetic effect of *Citrullus colocynthis* on *Rana exadactyla*. *Research Journal of Medicinal Plants*; 5 (3):338-342. Doi 10.3923/rjmp.2011.338.342

Rey J.F.G.S., 2010. Détermination des valeurs critiques pour l'antibiogramme vétérinaire par une approche de type Monte Carlo. *Thèse (pour l'obtention du diplôme docteur vétérinaire)*. Université de Toulouse, France. p 16.

S

Salgarolo P., 2003. Pratique des manipulations de chimie- à l'usage des biologistes. *Techniques & documentation- Lavoisier* : 229-237.

Sawaya W. N., Dagher N. J., Khan P., 2006. Chemical characterization and edibility of oil extracted from *Citrullus colocynthis* seeds. *Journal of food science*; volume 48, issue1: 104-106.

Sebbagh N., Cruciani-Guglielmacci C., Ouali F., Berthault M.F., Rouch C., Chabane Sari D., Magnan C., 2009. Comparative effects of *Citrullus colocynthis* , sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes&Metabolism* 35: 178-184.

Seger C., Sturm S., Mair ME., Ellmerer E, Stuppner H., 2005. ¹H and ¹³C NMR signal assignment of cucurbitacines derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecbalium elatrium* L. (Cucurbitaceae). *Magnetic resonance in chemistry*; 43: 489-491.
Doi:10.1002/mrc.1570

Seger C., Sturm S., 2007. HPLC-SPE-NMR-a novel hyphenation technique. *LC-GC Europe*; 20:587-597.

Shaheen A.M. and Hamed A.I., 2003. Comparative studies and nutritional values of some weedy species collected from newly reclaimed areas (Western shore of Lake Nasser, Aswan, Egypt). *Egypt.J.Biotechnol.*, 13: 176-186.

Simmons J.G., Akobundu E.N.T. and Cherry J.P., 1982. Chemical functional and Nutritional Properties of Egusi seed protein products. *Journal of Food Science*, 47 :829-835.

Sirois C., 2008. Valorisation des extraits de pin gris (*Pinus banksiana*) par l'étude de leurs compositions chimiques et leurs activités biologiques. *Mémoire. Université du Québec à Chicoutimi* ; 14-15 ; 31-33.

Skoog D.A., West D.M., James Holler F., Buess Herman, 1997. Chimie Analytique. Ed. De Boeck&Larcier s.a. p 841-842. ISBN 2-8041-2114-3

Soussy C.J., Nguyen J., Goldstein F., Dabernat H., Andremont A., Leqlercq R., Drugeon H., Cavallo P., Chardon H., Etienne J., RioY., and Courvalin P., 2003. In Vitro antibacterial activity of moxifloxacin against hospital isolates : a multicentre study. *Clinical Microbiology and infection* ; Volume 9 Number 10 : 997-1005.

Sturm S., Schneider P., Serger C., Stuppner H., 2009. Analysis of *Citrullus colocynthis* Cucurbitacine Derivatives with HPLC-SPE-NMR. *Scientia pharmaceutica* ; 77 : 254.
Doi :10.3797/scipharm. Oepfhg. 21. PO-55

I

Takagi T., Itabashi Y., 1981. Lipids, 16 : 546.

Tannin-Spitz T., Grossman S., Dovrat S., Gottlieb H.E. and Bergman M., 2007. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 73 :56-67.

Tehila S., Shlomo Grossman, Sara Dovrat, Hugo E., Gottlieb, Margalit Bergman, 2007. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochemical pharmacology*; 73: 56-67.

Trease G.E., 1976. A text-book on Pharmacognosy. *Bailliere Tindall and Cox*. London. England. P 646.

U

Udayasekhara Rao, P. 1994. Nutrient composition of some less-familiar oil seeds. *Food Chem.* 50 : 379- 382.

V

Vanier P., 2006. Course. Passeport santé. Net sur http://passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliment/Fiche.aspx?doc=courge_nu

W

Wikipédia, 2010. www.Wikipedia.com

Z

Ziyada A. K., Elhussein S. A., 2008. Physical and Chemical Characteristics of *Citrullus lanatus* Var. *Colocynthoide* Seed Oil. *Journal of Physical Science*; 19(2): 69–75.

Zohara Y., Shabelsky E., Schafferman D., 1999. Colocynth: Potential Arid Land Oilseed from an Ancient Cucurbit. *Perspectives on new crops and new uses*: 257- 262.